

Freie Universität Berlin  
Fachbereich Geowissenschaften

**Untersuchungen zur ökotoxikologischen Wirkung von  
Silbernanopartikeln – Der Weg von der Kläranlage bis zum Eintrag  
in landwirtschaftliche Flächen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium

Vorgelegt von  
Dipl.-Ing Karsten Schlich  
2013

Berlin, 2013

1. Gutachter: Professor Dr. mult. Dr. h. c. Konstantin Terytze

Freie Universität Berlin

Fachbereich Geowissenschaften

2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. Anna Gorbushina

Freie Universität Berlin

Fachbereich Geowissenschaften

Datum der Disputation: 28.02.2013

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre weiterhin, dass die Dissertation bisher nicht in dieser oder anderer Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Schmallenberg, den 08.01.2013

Dipl.-Ing Karsten Schlich

## Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

### Veröffentlichungen

Hund-Rinke, K., **Schlich, K.** und Wenzel, A. (2010): TiO<sub>2</sub> nanoparticles – Relationship between dispersion preparation method and ecotoxicity in the algal growth test. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 22 (5): 517-528.

**Schlich, K.**, Terytze, K. und Hund-Rinke, K. (2012): Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the earthworm reproduction test. *Environmental Sciences Europe* 24.

Hund-Rinke, K., **Schlich, K.** und Klawonn, T. (2012): Influence of application techniques on the ecotoxicological effects of nanomaterials in soil. *Environmental Sciences Europe* 24 (30).

**Schlich, K.**, Klawonn, T., Terytze, K. und Hund-Rinke, K. (2013): Effects of silver nanoparticles and silver nitrate in the earthworm reproduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 (1): 181-188.

## Vorträge

Hund-Rinke, K., **Schlich, K.**: TiO<sub>2</sub> particle and photocatalytic toxicity in the growth test with green algae. SETAC Europe 20<sup>th</sup> Annual meeting, Sevilla, Spain 23. – 27.05.2010

**Schlich, K.**, Hund-Rinke, K.: Wirkung von drei TiO<sub>2</sub> - Produkten im Regenwurm Reproduktionstest. Umwelt 2010 „Von der Erkenntnis zur Entscheidung“, 4. Gemeinsame Jahrestagung der GDCh-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie und der SETAC GLB, Dessau, 06. – 09.09.2010

Hund-Rinke, K., **Schlich, K.**, Tertyze K.: TiO<sub>2</sub> nanomaterials affect earthworm reproduction. SETAC Europe 21<sup>th</sup> Annual meeting, Milan, Italy 15. – 19.05.2011

Hund-Rinke, K., **Schlich, K.**: Application of TiO<sub>2</sub> in aquatic and terrestrial ecotox test systems. Prospect/OECD Sponsorship Programme Workshop, Ludwigshafen, 21. – 22.07.2011

Sonnack, L., Muth-Köhne, E., **Schlich, K.**, Hund-Rinke, K., Schäfers, C. Debus, R., Fenske, M.: Untersuchung zur Wirkung von Silber-Nanopartikeln im Zebrafish-Embryotest, unter Berücksichtigung von Kläranlagenprozessen. 16. SETAC-GLB Jahrestagung „Grenzen überwinden: UmweltCHEMIE & ÖkoTOXIKOLOGIE“, Landau, 18. – 20.09.2011

Hund-Rinke, K., **Schlich, K.**: Testung von Nanopartikeln (TiO<sub>2</sub>, Silber). Fachgespräch, Umweltbundesamt, Berlin, 17.11.2011

**Schlich, K.**, Hund-Rinke, K., Tertyze, K.: Präsentationen im Rahmen der Projekttreffen zum BMBF Forschungsverbund UMSICHT:

- Darstellung der Zielsetzung und geplanten Versuchsdurchführung. Marburg, 10. – 11.02.2011
- Präsentation der Zielsetzung, erster Ergebnisse und weiteren Versuchsplanung. Frankfurt, 10. – 11.05.2011
- Erste Ergebnisse und Ausblick. Hannover, 28. – 29.09.2011
- Präsentation der Ergebnisse zur Wirkung von NM-300K in Boden und Klärschlamm. Frankfurt, 12. - 13.03.2012

- Präsentation der Ergebnisse aus den Langzeitversuchen mit NM-300K.  
Dresden, 27. – 28.09.2012

**Schlich, K.**, Hund-Rinke, K., Terytze, K.: Long-term effects of sewage sludge spiked with Ag-NP on soil microorganisms. 6th SETAC World Congress, Berlin, 20. – 24.05.2012

**Schlich, K.**, Hund-Rinke, K., Terytze, K.: Fate and behaviour of different nanomaterials in the environment. Workshop FU Berlin „Approach for cooperation between Hebrew University of Jerusalem and Freie Universität Berlin“, Berlin, 28. – 29.06.2012

#### Poster

**Schlich, K.**, Hund-Rinke K., Terytze K.: Wirkung von Ag-NP auf Klärschlamm und mit Klärschlamm gedüngtem Boden. Clustertreffen NanoCare / NanoNature, Frankfurt 10. – 11.05.2011

**Schlich, K.**, Hund-Rinke K., Terytze K.: Langzeitverhalten von an Klärschlamm sorbierten Ag-NP bei der landwirtschaftlichen Klärschlammverwertung. Clustertreffen NanoCare / NanoNature, Frankfurt, 12. – 13.03.2012

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei den Personen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei

Frau Dr. Kerstin Hund-Rinke für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit am Fraunhofer IME anzufertigen zu dürfen, sowie für die Betreuung meiner Arbeit, die konstruktive Kritik, ihr großes Engagement und das Vertrauen, dass in meine Arbeit gesteckt wurde;

Herrn Prof. Dr. mult. Dr. h. c. Konstantin Terytze von der FU Berlin für die externe Betreuung meiner Promotionsarbeit und die konstruktive Kritik;

Frau Prof. Dr. rer. nat. Anna Gorbushina für die freundliche Annahme und Begutachtung dieser Dissertation;

Herrn Dipl.-Ing. Martin Hoppe (Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe) und Herrn Dipl.-Ing. André Nogowski (Technische Universität Dresden) für Ihre Gesprächsbereitschaft zu verschiedenen Fragestellungen und die gute praktische Zusammenarbeit;

den Mitarbeitern der Abteilung Ökotoxikologie Ruben Schlinkert, Katja Mock, Frauke Kleinehr und Theo Görtz für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche, speziell auch an den Wochenenden;

Ruben Schlinkert, Diana Homrighausen, Dirk Hansknecht, Julia Boike, Pamela Schulte, Elena Bergendahl, Cecilia Diaz, Annabel Clouston und Rainer Peters dafür, dass Sie dafür gesorgt haben, dass ich mich auch nach 4 Jahren im Hochsauerland immer noch wohl fühle;

meinen Kolleginnen und Kollegen im Fachbereich Geowissenschaften, der AG Organische Umweltgeochemie sowie allen, die mir mit Rat und Tat geholfen haben, für Ihren Zuspruch und Ihrer Bereitschaft zum Meinungsaustausch.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner gesamten Familie und bei meiner Freundin für die Unterstützung, das Vertrauen und das Verständnis, dass mir in den Jahren meiner Arbeit entgegengebracht wurde.

***Diese Promotionsarbeit widme ich Euch.***

## Kurzzusammenfassung

Das Ziel dieser Promotionsarbeit bestand in der Anfertigung einer Risikocharakterisierung für ein Silbernanopartikel (NM-300K) in Böden für den Klärschlammfad. Mit Klärschlammfad ist das Aufbringen von silbernanopartikelhaltigem Klärschlamm auf landwirtschaftliche Nutzflächen gemeint.

Im Atmungshemmtest nach OECD Richtlinie 209 (1984) hat sich gezeigt, dass die Wirkung von NM-300K in der Kläranlage stark von der Zusammensetzung des Abwassers abhängig ist. Vor allem die Konzentration der verschiedenen Salze scheint eine große Rolle zu spielen.

Die Kläranlagensimulationen haben bestätigt, dass bei umweltrelevanten Konzentrationen > 90% der Silbernanopartikel im Klärschlamm verbleiben und nicht in den Vorfluter gelangen. An Klärschlamm gebundene Silbernanopartikel (NM-300K) entfalten nach Abbau des Klärschlammes durch die Bodenmikroorganismen wieder die Wirkung von reinem NM-300K. Diese Aussage gilt nur für entwässerten, nicht gefaulten Klärschlamm. Es bestehen Hinweise darauf, dass durch die Faulung von Klärschlamm eine langfristige Detoxifizierung von Silbernanopartikeln bewirkt wird. Weitere Untersuchungen sind zur Untermauerung notwendig.

Die Risikocharakterisierung zeigt, dass die PNEC für NM-300K in Böden bei 0,05 mg/kg TM Boden und für den Klärschlammfad bei 30 mg/kg TS Klärschlamm liegt. Nur wenige Informationen zum Verbleib von Silbernanopartikeln in Böden sind gegenwärtig vorhanden. Es gibt Hinweise darauf, dass die Mobilität im Boden eingeschränkt ist. Bei einer Applikation von Klärschlamm aus kommunalen Kläranlagen mit Silbergehalten von 2-50 mg/kg TS Klärschlamm und einer Akkumulation an Silber in Böden, wären Gehalte die der PNEC entsprechen schnell erreicht. Der Vergleich von PEC-Werten aus Modellrechnungen für Böden, auf den mit Silbernanopartikeln belasteter Klärschlamm ausgebracht wurde, mit den in dieser Arbeit abgeleiteten PNECs für NM-300K zeigt, dass bei wiederholter Applikation von Klärschlamm ein Risiko für Organismen des terrestrischen Ökosystems nicht ausgeschlossen werden kann.

## Abstract

The main goal of this PhD thesis was the preparation of a risk characterisation of a specific silver nanoparticle (NM-300K) in soils for the sewage-sludge pathway. The sewage-sludge pathway is, in this context, the application of sewage sludge that contains silver nanoparticles to agricultural land.

In the respiration inhibition test, performed according to OECD Guideline 209 (1984), the effects of NM-300K in a wastewater treatment plants (WWTP) are highly dependent on the composition of the wastewater. The concentration of various salts seems to play a major role.

The simulation of WWTPs has confirmed that at environmentally relevant concentrations, >90% of silver nanoparticles remain in sewage-sludge and may not reach the water course. The effects of NM-300K bound to sewage-sludge can be minimised to those of pure NM-300K after the sewage-sludge is processed by micro-organisms (for dewatered sewage-sludge only, not digested sludge). There is evidence that through the digestion of sewage sludge a long-term detoxification of silver nanoparticles occurs. Further studies are necessary to substantiate this hypothesis.

The risk characterization also showed that the PNEC for NM-300K in the soils is 0.05 mg/kg dry matter soil while for the sewage-sludge pathway the PNEC is 30 mg/kg dry matter sludge. Little information on the fate of silver nanoparticles in soil is currently available, however, there are indications that the mobility is limited in the soil. With accumulation of silver nanoparticles in soils from agricultural application of sewage-sludge from WWTPs, containing 2-50 mg/kg dry matter sludge, the PNEC for soils would be reached quickly. The comparison of PEC values from model calculations for silver nanoparticles in soil (applied via sewage-sludge) with PNEC values for NM-300K indicates that risk to terrestrial ecosystem organisms from repeated sewage-sludge application cannot be excluded.

## Inhaltsverzeichnis

Curriculum vitae

Danksagung

Kurzzusammenfassung

Abstract

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Glossar .....	XII
Abkürzungsverzeichnis .....	XV
<b>1 Einleitung und Zielsetzung .....</b>	<b>18</b>
<b>2 Aktueller Kenntnisstand.....</b>	<b>21</b>
2.1 Einsatz von Silbernanopartikeln.....	21
2.2 Freisetzung von Silbernanopartikeln aus Textilien.....	22
2.3 Verbleib von Silbernanopartikeln in der Kläranlage .....	24
2.4 Einsatz von Klärschlamm als landwirtschaftlicher Dünger .....	25
<b>3 Strukturierung der Arbeit.....</b>	<b>27</b>
<b>4 Material und Methoden.....</b>	<b>30</b>
4.1 Chemikalien .....	30
4.1.1 Nanopartikel NM-300K.....	30
4.1.2 Dispersant NM-300K DIS.....	31
4.1.3 Referenzmaterial Silbernitrat .....	31
4.1.4 Flockungsmittel.....	31
4.1.5 Textilfasern .....	32
4.2 Testorganismen .....	32
4.2.1 Bodenmikroflora.....	32
4.2.2 Kompostwurm <i>Eisenia andrei</i> .....	33
4.2.3 Pflanzensamen .....	34
4.2.4 Klärschlamm .....	34
4.3 Applikationsmethodik.....	35
4.3.1 Herstellung der Stammsuspensionen .....	35
4.3.2 Applikation des Testgegenstandes auf den Versuchsboden .....	35
4.4 Ökotoxikologische Testverfahren.....	36

4.4.1	C-Transformation (OECD Richtlinie 217).....	36
4.4.2	Potentielle Ammoniumoxidation (ISO 15685) .....	37
4.4.3	Mikrobielle Bodendiversität (ISO/TS 22939) .....	38
4.4.4	Regenwurm Reproduktionstest (OECD Richtlinie 222) .....	40
4.4.5	Regenwurm Fluchttest (ISO 17512-1) .....	41
4.4.6	Pflanzentest (OECD Richtlinie 208).....	42
4.4.7	Atmungshemmtest (OECD Richtlinie 209).....	43
4.4.8	Kläranlagensimulation (OECD Richtlinie 303A) .....	45
4.4.9	Manometrischer Respirationstest (OECD Richtlinie 301 F) .....	47
4.5	Langzeitversuche.....	48
4.5.1	Langzeitversuch 1.....	48
4.5.2	Langzeitversuch 2.....	50
4.5.3	Langzeitversuch 3.....	52
4.5.4	Langzeitversuch 4.....	53
4.5.5	Langzeitversuch 5.....	55
4.6	Chemische Analytik .....	56
4.6.1	„Diffusive gradients in thin films“ Verfahren .....	56
4.6.2	Aufschluss und Messung von Ag-haltigen Bodenproben und Regenwürmern .....	57
4.6.3	Aufschluss und Messung von Ag-haltigen wässrigen Proben und von Klärschlamm .....	59
4.7	Statistische Auswertung und Konzentrations-Wirkungs-Kurven .....	60
<b>5</b>	<b>Untersuchung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> nach Richtlinie – Wirkung im terrestrischen Ökosystem und auf Klärschlamm .....</b>	<b>63</b>
5.1	Vorversuche.....	64
5.1.1	Applikation von NM-300K auf Boden .....	64
5.1.2	Stabilität der NM-300K Stammsuspension .....	64
5.1.3	Abbauversuch mit NM-300K DIS .....	67
5.2	C-Transformation.....	67
5.3	Potentielle Ammoniumoxidation.....	71
5.4	Regenwurm Reproduktionstest.....	75
5.5	Regenwurm Fluchttest.....	83
5.6	Pflanzenwachstum.....	84
5.7	Atmungshemmtest.....	90
5.8	Kläranlagensimulation.....	93
5.9	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	104

<b>6</b>	<b>Auswirkung von Abwasserkomponenten auf die Wirkung von NM-300K</b> .....	<b>109</b>
6.1	Modifikation des synthetischen Abwasser .....	109
6.2	Modifikation des pH-Wertes.....	110
6.2.1	Modifikation des pH-Wertes vor Klärschlammzugabe .....	110
6.2.2	Modifikation des pH-Wertes nach Klärschlammzugabe.....	112
6.3	Zugabe eines Komplexbildner .....	113
6.3.1	Komplexbildner (Natriumhexametaphosphat).....	113
6.3.2	Komplexbildner (Nitrilotriessigsäure; kurz NTA) .....	114
6.4	Wirkung von AgNP-haltigem Fasermaterial.....	116
6.4.1	Indirekter Kontakt mit Fasern.....	116
6.4.2	Direkter Kontakt mit Fasern .....	117
6.5	Zugabe von Waschwasser.....	118
6.6	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	119
<b>7</b>	<b>Realistisches Nutzungsszenario – Wirkung von AgNP-haltigem Klärschlamm als landwirtschaftlicher Dünger auf die Bodenmikroorganismen</b> .....	<b>121</b>
7.1	Langzeitversuch 1.....	123
7.1.1	Begleitanalytik im Boden.....	123
7.1.2	Potentielle Ammoniumoxidation.....	124
7.1.3	C-Transformation.....	126
7.1.4	Mikrobielle Bodendiversität.....	128
7.1.5	Pflanzentest.....	130
7.2	Langzeitversuch 2.....	132
7.2.1	Kläranlagensimulation.....	132
7.2.2	Begleitanalytik im Boden.....	135
7.2.3	Potentielle Ammoniumoxidation.....	136
7.2.4	C-Transformation.....	139
7.2.5	Basalatmung.....	141
7.2.6	Pflanzentest.....	143
7.3	Langzeitversuch 3.....	145
7.3.1	Begleitanalytik.....	145
7.3.2	Potentielle Ammoniumoxidation.....	145
7.3.3	C-Transformation.....	148
7.3.4	Basalatmung.....	150
7.4	Langzeitversuch 4.....	152

7.4.1 Kläranlagensimulation.....	152
7.4.2 Begleitanalytik in Boden.....	154
7.4.3 Potentielle Ammoniumoxidation.....	155
7.4.4 C-Transformation.....	158
7.4.5 Basalatmung.....	161
7.4.6 Mikrobielle Bodendiversität.....	163
7.4.7 Pflanzentest.....	165
7.5 Langzeitversuch 5.....	166
7.5.1 Begleitanalytik.....	166
7.5.2 Potentielle Ammoniumoxidation.....	168
7.5.3 C-Transformation.....	170
7.5.4 Basalatmung.....	172
7.6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	174
7.6.1 Allgemeine Aussagen.....	176
7.6.2 Kläranlagen.....	177
7.6.3 Potentielle Ammoniumoxidation.....	177
7.6.4 C-Transformation.....	181
7.6.5 Basalatmung.....	185
7.6.6 Mikrobielle Bodendiversität.....	188
7.6.7 Pflanzentest.....	189
<b>8 Risikocharakterisierung aus den erzielten Ergebnissen für NM 300K.....</b>	<b>192</b>
8.1 Grundlage einer Risikocharakterisierung.....	192
8.2 Risikocharakterisierung zum Klärschlammfad.....	193
8.3 Untersuchung von NM-300K nach Richtlinie.....	193
8.4 Durchführung der Risikocharakterisierung.....	194
<b>9 Diskussion.....</b>	<b>195</b>
9.1 Verbleib von Silbernanopartikeln in der Kläranlage.....	195
9.2 Wirkung und mögliche Transformationen von Silbernanopartikeln in der Kläranlage.....	196
9.3 Grunddatensatz zur Wirkung von NM-300K.....	206
9.4 Aktuelle Silbergehalte im Klärschlamm kommunaler Kläranlagen.....	220
<b>10 Schlussfolgerung.....</b>	<b>223</b>
<b>11 Zusammenfassung / Summary.....</b>	<b>225</b>
11.1 Deutsche Version.....	225
11.2 English version.....	231

<b>12</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>236</b>
<b>13</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>244</b>
13.1	Anhang zu Kapitel 5.....	244
13.2	Anhang zu Kapitel 7.....	255

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturierung der Arbeit .....	29
Abbildung 2: TEM Aufnahme von NM-300K in Reinstwasser .....	30
Abbildung 3: TEM Aufnahme von NM-300K in OECD Algen-medium .....	30
Abbildung 4: Beispiel einer typischen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung .....	61
Abbildung 5: Kläranlagensimulation mit AgNO <sub>3</sub> - DOC-Elimination .....	95
Abbildung 6: Kläranlagensimulation mit NM-300K - DOC-Elimination .....	101
Abbildung 7: Langzeitversuch 1 – Nitritproduktion .....	125
Abbildung 8: Langzeitversuch 1 – Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	125
Abbildung 9: Langzeitversuch 1 – Mikrobielle Biomasse .....	127
Abbildung 10: Langzeitversuch 1 - Hemmung der mikrobiellen Biomasse durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	127
Abbildung 11: Langzeitversuch 1 - Enzymaktivität von Bodenmikroorganismen nach 32 Tagen .....	129
Abbildung 12: Langzeitversuch 1 - Enzymaktivität von Bodenmikroorganismen nach 100 Tagen .....	130
Abbildung 13: Langzeitversuch 2 - DOC-Elimination in der Kläranlagen- simulation .....	133
Abbildung 14: Langzeitversuch 2 – Nitritproduktion .....	138
Abbildung 15: Langzeitversuch 2 - Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	138
Abbildung 16: Langzeitversuch 2 – Mikrobielle Biomasse .....	140
Abbildung 17: Langzeitversuch 2 - Hemmung der mikrobiellen Biomasse durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	141
Abbildung 18: Langzeitversuch 2 – Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen .	142
Abbildung 19: Langzeitversuch 2 - Hemmung der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	143
Abbildung 20: Langzeitversuch 3 – Nitritproduktion .....	147
Abbildung 21: Langzeitversuch 3 - Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	147
Abbildung 22: Langzeitversuch 3 – Mikrobielle Biomasse .....	149
Abbildung 23: Langzeitversuch 3 - Hemmung der mikrobiellen Biomasse durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	149
Abbildung 24: Langzeitversuch 3 - Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen ..	151
Abbildung 25: Langzeitversuch 3 - Hemmung der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	151

Abbildung 26: Langzeitversuch 4 - DOC-Elimination bei Kläranlagensimulation.....	154
Abbildung 27: Langzeitversuch 4 - Nitritproduktion .....	157
Abbildung 28: Langzeitversuch 4 - Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	158
Abbildung 29: Langzeitversuch 4 - Mikrobielle Biomasse .....	160
Abbildung 30: Langzeitversuch 4 - Hemmung der mikrobiellen Biomasse durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	160
Abbildung 31: Langzeitversuch 4 - Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen ..	162
Abbildung 32: Langzeitversuch 4 - Hemmung der Atmungsaktivität durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	162
Abbildung 33: Langzeitversuch 4 - Enzymaktivität von Bodenmikroorganismen nach 60 Tagen .....	164
Abbildung 34: Langzeitversuch 4 - Enzymaktivität von Bodenmikroorganismen nach 100 Tagen .....	164
Abbildung 35: Langzeitversuch 5 - Nitritproduktion .....	169
Abbildung 36: Langzeitversuch 5 - Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	170
Abbildung 37: Langzeitversuch 5 - Mikrobielle Biomasse .....	171
Abbildung 38: Langzeitversuch 5 - Hemmung der mikrobiellen Biomasse durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	172
Abbildung 39: Langzeitversuch 5 - Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen ..	173
Abbildung 40: Langzeitversuch 5 - Hemmung der Atmungsaktivität durch NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	174

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Textilfasern im Atmungs- hemmtest.....	32
Tabelle 2: Physikalisch-chemische Eigenschaften (Refesol 01A).....	33
Tabelle 3: Grenzwerte der AbfKlärV für die Nutzung von Klärschlamm sowie die in dem verwendeten Klärschlamm gemessenen Gehalte .....	34
Tabelle 4: Fluorogene Substanzen zur Messung der Enzymaktivität.....	40
Tabelle 5: Versuchsübersicht – Untersuchungen nach Richtlinie .....	63
Tabelle 6: Verteilung von NM-300K in Boden nach Applikation über Träger- material .....	64
Tabelle 7: Ergebnis zur Untersuchung der Stabilität der NM-300K Stamm suspension.....	66
Tabelle 8: Ergebnisse des Abbauversuchs mit NM-300K DIS .....	67
Tabelle 9: Ergebnisse der C-Transformation mit NM-300K.....	68
Tabelle 10: Ergebnisse der C-Transformation mit AgNO <sub>3</sub> .....	69
Tabelle 11: NOEC-, EC <sub>10</sub> - und EC <sub>50</sub> -Werte in den Versuchen zur Wirkung von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> im C-Transformationstest .....	70
Tabelle 12: Ergebnisse der potentiellen Ammoniumoxidation mit NM-300K.....	72
Tabelle 13: Ergebnisse der potentiellen Ammoniumoxidation mit AgNO <sub>3</sub> .....	73
Tabelle 14: NOEC-, EC <sub>10</sub> - und EC <sub>50</sub> -Werte in den Versuchen zur Wirkung von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> bei der Potentiellen Ammoniumoxidation .....	74
Tabelle 15: Ergebnisse des Regenwurm Reproduktionstest mit NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	76
Tabelle 16: NOEC-, EC <sub>10</sub> -, EC <sub>20</sub> - und EC <sub>50</sub> -Werte aus den Regenwurm Reproduktionstests mit NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	77
Tabelle 17: Gemessener Ag-Gehalt in <i>Eisenia andrei</i> aus den Reproduktionsversuchen.....	80
Tabelle 18: Messungen der freien Ag-Ionen im Bodenporenwasser via DGT Technik.....	82
Tabelle 19: Ergebnisse des Regenwurm Fluchttest mit NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	84
Tabelle 20: Ergebnisse des Pflanzentest mit NM-300K .....	85
Tabelle 21: Ergebnisse des Pflanzentest mit AgNO <sub>3</sub> .....	86
Tabelle 22: Ergebnisse Validierungsversuchs mit NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	86
Tabelle 23: NOEC-, EC <sub>25</sub> - und EC <sub>50</sub> -Werte aus dem Pflanzenwachstumstest mit NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	87
Tabelle 24: Ergebnis der Atmungs hemmtests mit NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	91
Tabelle 25: Ergebnis des Validierungsversuches mit NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	91

Tabelle 26: NOECs und EC <sub>50</sub> aus den Atmungshemmtests mit NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	92
Tabelle 27: Ergebnisse der chemischen Analytik von Ein- und Auslaufproben der Kläranlagensimulation mit AgNO <sub>3</sub> .....	98
Tabelle 28: Ag-Gehalt der Stammlösung an verschiedenen Zeitpunkten in der Kläranlagensimulation mit AgNO <sub>3</sub> .....	99
Tabelle 29: Ergebnisse der chemischen Analytik von Ein- und Auslaufproben der Kläranlagensimulation mit NM-300K .....	103
Tabelle 30: Erkenntnisse aus den Kläranlagensimulationen mit NM-300K und AgNO <sub>3</sub> .....	104
Tabelle 31: Veränderung der Toxizität von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> durch die Modifikation des synthetischen Abwassers .....	110
Tabelle 32: Veränderung der Wirkung von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> bei einer Modifikation des pH-Wertes .....	111
Tabelle 33: Veränderung der Wirkung von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> bei einer Modifikation des pH-Wertes .....	112
Tabelle 34: Veränderung der Wirkung von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> bei Zugabe eines Komplexbildners (Calgon).....	114
Tabelle 35: Veränderung der Wirkung von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> bei Zugabe eines Komplexbildners (NTA).....	115
Tabelle 36: Wirkung von mit AgNP beladenen Fasern im Atmungshemmtest .....	116
Tabelle 37: Wirkung von mit AgNP beladenen Fasern im Atmungshemmtest .....	117
Tabelle 38: Ergebnisse zur veränderten Wirkung von NM-300K bei Zugabe von Waschwasser im Atmungshemmtest .....	119
Tabelle 39: Langzeitversuch 1 - Begleitanalytik (pH und Bestimmung der Ag-Gehalte).....	123
Tabelle 40: Langzeitversuch 1 - Pflanzentest mit <i>Phaseolus aureus</i> L. nach 180 Tagen .....	132
Tabelle 41: Langzeitversuch 1 - Ag-Gehalt in Wurzeln, Spross und Blättern .....	132
Tabelle 42: Langzeitversuch 2 - Bilanzierung des Verbleibs von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> in der Kläranlage .....	134
Tabelle 43: Langzeitversuch 2 - Begleitanalytik (pH-Werte und Ag-Gehalte).....	136
Tabelle 44: Langzeitversuch 2 - Pflanzentest mit <i>Phaseolus aureus</i> L., durchgeführt nach 140 Tagen Alterung des Versuchsbodens.....	144
Tabelle 45: Langzeitversuch 3 - Begleitanalytik (pH-Werte).....	145
Tabelle 46: Langzeitversuch 4 - Bilanzierung des Verbleibs von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> in der Kläranlage .....	153
Tabelle 47: Langzeitversuch 4 - Begleitanalytik (Ag-Gehalt; pH-Werte).....	155
Tabelle 48: Langzeitversuch 4 - Pflanzentest mit <i>Phaseolus aureus</i> L. nach 32 Tagen und 100 Tagen Alterung.....	166

Tabelle 49: Langzeitversuch 5 - Begleitanalytik (pH und Bestimmung der Ag-Gehalte).....	167
Tabelle 50: Übersicht über die durchgeführten Langzeitversuche (Applikationsart, Bodengehalte, Testsysteme) .....	175
Tabelle 51: Wirkung von Klärschlamm auf die Nitrifikanten im Vergleich der Klärschlammkontrolle mit der Kontrolle .....	178
Tabelle 52: Veranschaulichung der Wirkung von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> auf die Nitrifikanten in den Langzeitversuchen 1 bis 5 .....	180
Tabelle 53: Wirkung von Klärschlamm auf die Biomasseproduktion im Vergleich der Klärschlammkontrolle mit der Kontrolle .....	182
Tabelle 54: Veranschaulichung der Wirkung von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> auf die Biomasseproduktion in den Langzeitversuchen 1 bis 5.....	184
Tabelle 55: Wirkung von Klärschlamm auf die Atmungsaktivität im Vergleich der Klärschlammkontrolle mit der Kontrolle .....	186
Tabelle 56: Veranschaulichung der Wirkung von NM-300K und AgNO <sub>3</sub> auf die Atmungsaktivität in den Langzeitversuchen 2 bis 5.....	188
Tabelle 57: Kläranlagensimulation mit AgNO <sub>3</sub> - Begleitanalytik .....	245
Tabelle 58: Kläranlagensimulation mit AgNO <sub>3</sub> - DOC-Elimination.....	247
Tabelle 59: Kläranlagensimulation mit NM-300K - Begleitanalytik .....	249
Tabelle 60: Kläranlagensimulation mit NM-300K - DOC-Elimination in Anlage 1 ....	251
Tabelle 61: Kläranlagensimulation mit NM-300K - DOC-Elimination in Anlage 2 ....	252
Tabelle 62: Kläranlagensimulation mit NM-300K - DOC-Elimination in Anlage 3 ....	253
Tabelle 63: Kläranlagensimulation mit NM-300K - DOC-Elimination in Anlage 4 ....	254
Tabelle 64: Langzeitversuch 1 – Potentielle Ammoniumoxidation.....	256
Tabelle 65: Langzeitversuch 1 - C-Transformation.....	258
Tabelle 66: Langzeitversuch 1 – Mikrobielle Bodendiversität (Enzymaktivität).....	260
Tabelle 67: Langzeitversuch 2 - Begleitanalytik der Kläranlagensimulation .....	261
Tabelle 68: Langzeitversuch 2 - DOC-Elimination bei der Kläranlagensimulation...	263
Tabelle 69: Langzeitversuch 2 - Potentielle Ammoniumoxidation .....	265
Tabelle 70: Langzeitversuch 2 - C-Transformation.....	267
Tabelle 71: Langzeitversuch 2 - Basalatmung.....	269
Tabelle 72: Langzeitversuch 3 - Potentielle Ammoniumoxidation .....	271
Tabelle 73: Langzeitversuch 3 - C-Transformation.....	272
Tabelle 74: Langzeitversuch 3 - Basalatmung.....	273
Tabelle 75: Langzeitversuch 4 - Begleitanalytik zur Kläranlagensimulation .....	274
Tabelle 76: Langzeitversuch 4 - DOC-Elimination bei der Kläranlagensimulation...	276
Tabelle 77: Langzeitversuch 4 - Potentielle Ammoniumoxidation .....	278

Tabelle 78: Langzeitversuch 4 - C-Transformation.....	280
Tabelle 79: Langzeitversuch 4 – Basalatmung.....	282
Tabelle 80: Langzeitversuch 4 – Mikrobielle Bodendiversität (Enzymaktivität).....	284
Tabelle 81: Langzeitversuch 5 - Potentielle Ammoniumoxidation .....	285
Tabelle 82: Langzeitversuch 5 – C-Transformation.....	287
Tabelle 83: Langzeitversuch 5 - Basalatmung.....	289

## Glossar

Chlorosen	Die Chlorose beschreibt die mangelnde Ausbildung des Blattgrüns.
Coating	Schicht auf der Oberfläche eines Partikels zum Schutz und zur Funktionalisierung.
Destruenten	Organismus der organische Substanz abbaut und zu anorganischer Substanz reduziert (z.B. Mikroorganismen, Regenwürmer).
Dispersant	Flüssigkeit zur Unterstützung von Dispersionen bzw. zum Erhalt der Verteilung von Partikeln in einer Suspension.
EC <sub>50</sub>	Bezeichnet in biologischen Tests die mittlere Konzentration eines Stoffes im Medium, bei der 50 % des Effektes innerhalb der Versuchsdauer auftritt (Fent, 2007).
EC <sub>x</sub>	Konzentration einer Substanz bei der über einen bestimmten Expositionszeitraum ein Effekt von x% auf einen Testorganismus im Vergleich zur Kontrolle auftritt.
LOEC	Niedrigste Konzentration einer Substanz, die einen statistisch signifikanten Effekt ( $p < 0,05$ ) auf einen Organismus hervorruft.
Lösung	Homogenes Gemisch aus mindestens zwei chemischen Stoffen.
Mikrobielle Biomasse	In Böden vorhandene Biomasse an Mikroorganismen.

Nanomaterial	„Nanomaterial“ ist ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben (Europäische Kommission, Oktober 2011).
Nanopartikel	Ein Nanopartikel ist ein Partikel mit allen drei Außenmaßen im Nanomaßstab von 1 – 100 nm (DIN CEN ISO/TS 27687:2008).
Nekrosen	Die Nekrose beschreibt das Absterben von Zellen, Gewebs- oder Organbezirken als pathologische Reaktion auf bestimmte Einwirkungen. Im Pflanzentest kennzeichnet sich die Nekrose durch den Verlust der Blätter.
Nitrifikanten	Gram negative aerobe Bakterien die durch ihren Stoffwechsel entweder Ammoniumionen zu Nitrit oder Nitriten zu Nitrat oxidieren.
Nitrifikation	Die Nitrifikation ist der Oberbegriff für die bakterielle Oxidation von Ammoniak zu Nitrat.
Nitritproduktion	Umwandlung von, dem Testsystem zugefügten, Ammonium zu Nitrit durch die Nitrifikanten im Boden.
NOEC	Höchste Konzentration einer Substanz, unterhalb des LOEC, bei der kein Effekt auf einen Organismus hervorgerufen wird.
Produzenten	Lebewesen, die anorganische Stoffe in organische Materie (Biomasse) umwandeln können.

Relative Standardabweichung	Ein Schätzwert für die Standardabweichung einer Gesamtheit aus einer Probe von n Ergebnissen, geteilt durch den Mittelwert. Oft auch als Variationskoeffizient bezeichnet. Häufig auch als Prozentwert angegeben (EURACHEM/CITAC, 2004).
Repellent	Wirkstoff, der von einem Organismus wahrgenommen wird und diesen abschreckt, ohne den Organismus dabei zu töten.
Sulfidierung	Einführung von Schwefel in eine Verbindung in Form einer Thiol- oder Sulfidgruppe.
Suspension	Heterogenes Stoffgemisch aus einer Flüssigkeit und darin fein verteilten Feststoffen.
Theoretischer Sauerstoffbedarf	Rechengröße für die Abbaubarkeit von Substanzen.
Trophieebene	Stellung von Lebewesen im Nahrungsnetz bestehend aus Primärproduzenten, Primär-, Sekundär-, sowie Tertiärkonsumenten und Destruenten.

## Abkürzungsverzeichnis

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Diammoniumsulfat
AbfKlärV	Deutsche Klärschlammverordnung
$\text{Ag}_2\text{S}$	Silbersulfid
$\text{AgNO}_3$	Silbernitrat
AgNP	Silbernanopartikel
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
AOX	Adsorbierbare organische Halogenverbindungen
$\text{CaCl}_2$	Calciumchlorid
CAS	Chemical Abstracts Service
$C_{\text{mik}}$	Mikrobielle Biomasse
$C_{\text{org}}$	Organischer Kohlenstoff
CV	Variationskoeffizient
$d_f$	Bodendichte
DGT	Diffusive gradients in thin films
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOC	Dissolved Organic Carbon (Gelöster organischer Kohlenstoff)
$\text{EC}_x$	Effektive Konzentration; Konzentration, bei der x% der Versuchsorganismen einen bestimmten Effekt zeigen
ECHA	European Chemical Agency
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EN	Europäische Normen
Fraunhofer IME	Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie
$\text{H}_2\text{O}$	Wasser
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Massenspektrometrie mittels induktiv gekoppeltem Plasma)
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppeltem Plasma)
ISO	International Organization for Standardization

$K_2HPO_4$	Dikaliumhydrogenphosphat
K	Kontrolle
$KAK_{eff}$	Effektive Kationenaustauschkapazität
KD	Dispersantenkontrolle
$KH_2PO_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
KK	Klärschlammkontrolle
KOH	Kaliumhydroxid
L.	Linné
LOEC	Lowest observed effect concentration
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MUF	4-Methylumbelliferyl-phosphat
n.b.	nicht bestimmt nicht bestimmbar
n.d.	not determined
NaCl	Natriumchlorid
$NaClO_3$	Natriumchlorat
Nanometer	nm $10^{-9}$ , 1000 pm entspricht einem Millardstel Meter
NG	Nachweisgrenze
$N_{gesamt}$	Gesamt-Stickstoff
NIST	National Institute of Standards and Technologies
Nitrit-N	Stickstoffanteil des Nitrits
$NO_2-N$	
NOEC	No observed effect concentration
NTA	Nitrilotriessigsäure
OECD	Organization of Economic Cooperation and Development
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCDD	Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine
PCDF	Polychlorierte Dibenzofurane
PEC	Predicted environmental concentration
PNEC	Predicted no effect concentration
RefeSol 01A	Referenzboden 01A (Braunerde)

rpm	rounds per minute
SOP	Standard Operating Procedure
Stabw.	Standardabweichung
TBT	Tributylzinnhydrid
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TM	Trockenmasse (bei Boden)
TMDA-70	Zertifiziertes Referenzmaterial; angereichertes Seewasser
TS	Trockensubstanz (bei Klärschlamm)
TU Dresden	Technische Universität Dresden
UHQ	Ultra high quality
WHK <sub>max</sub>	maximale Wasserhaltekapazität

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Aktuell werden Silbernanopartikel wegen ihrer antibakteriellen Eigenschaften in zahlreichen Produkten verschiedenster Art eingesetzt. Nach Angaben des „Inventory of Nanotechnology-based Consumer Products (Project on Emerging Nanotechnologies)“, werden derzeit Silbernanopartikel in mehr als 313 kommerziell vertriebenen Produkten genutzt. Dabei werden die Silbernanopartikel vorrangig in Produkten der Gesundheitsvorsorge und in Fitnessprodukten eingesetzt, welche Körperpflege- und Kosmetikartikel genauso umfassen wie Kleidung und Sportbekleidung (Woodrow Wilson International Center for Scholars 2011).

Die zunehmende und immer vielfältiger werdende Nutzung von Silbernanopartikeln erhöht das Risiko der Freisetzung dieser Partikel aus den Produkten in die Umwelt. Berechnungen zur Exposition der Umwelt mit Silbernanopartikeln, basierend auf einer Materialflussanalyse auf Basis des Lebenszyklus verschiedener Nanopartikel, deuten daraufhin, dass es zu Beeinträchtigungen aquatischer Organismen durch Silbernanopartikel im Auslauf einer Kläranlage kommen kann (Gottschalk et al. 2010). Zahlreiche Studien zur Wirkung von Silbernanopartikeln auf Organismengruppen im Bereich der aquatischen und terrestrischen Ökotoxikologie wurden durchgeführt. Im aquatischen Bereich zeigte sich dabei, dass reine Silbernanopartikel eine starke toxische Wirkung auf Fische (Bilberg et al. 2010, Farkas et al. 2010, Griffitt et al. 2012), Daphnien (Allen et al. 2010) und Algen (Oukarroum et al. 2012) haben. Auch auf Organismen im terrestrischen Ökosystem ergab sich eine toxische Wirkung auf z.B. die Reproduktion von Würmern (Tsyusko et al. 2012, Schlich et al. 2013) sowie auf die mikrobielle Biomasse und die Enzymaktivität in Böden (Hänsch und Emmerling 2010). Die aufgeführten Untersuchungen wurden alle mit reinen Silbernanopartikeln durchgeführt und liefern wichtige Informationen für eine Risikocharakterisierung.

Im Zusammenhang mit einer Risikocharakterisierung für Silbernanopartikel stellt sich neben der Frage der Wirkung auch die, ob und wie Silbernanopartikel von einem Produkt (z.B. Textilien oder Wandfassaden) freigesetzt werden. Zu diesem Thema gibt es ebenfalls zahlreiche Studien, die belegen, dass es zu einer Freisetzung von Silbernanopartikeln aus Textilien (Benn und Westerhoff 2008, Geranio et al. 2009), aus silbernanopartikelhaltigen Waschmaschinen (Farkas et al. 2011) und auch

Wandfassaden (Kaegi et al. 2010) kommt. Bei einer Freisetzung sind die Silbernanopartikel verschiedenen Einflüssen des Umgebungsmediums ausgesetzt, die zu einer Veränderung ihrer Eigenschaften führen. In diesem Fall wird sich wahrscheinlich auch die Wirkung auf die verschiedenen Organismen ändern. Es ist nicht möglich eine Risikocharakterisierung durchzuführen, ohne neben der reinen nanopartikulären Form auch Modifizierungen und Transformationsprozesse zu betrachten (Nowack et al. 2012). Speziell die Wirkung von Nanopartikeln in Langzeitversuchen und die Aufnahme der Nanopartikel durch Organismen stellt ein schwieriges Thema dar (Som et al. 2011). Hierzu zählt unter anderem die Wirkung von nanopartikelhaltigem Klärschlamm, der als landwirtschaftlicher Dünger auf Ackerflächen aufgebracht werden kann.

Die in dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen erfolgten im Rahmen des Forschungsprojektes „Umsicht – Abschätzung der Umweltgefährdung durch Silber-Nanomaterialien: vom chemischen Partikel bis zum technischen Produkt.“, gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (2010 - 2013), und wurden am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie in Schmallenberg durchgeführt.

Ziel dieses Forschungsprojektes war die Generierung grundlegender Daten zu Verhalten, Verbleib und Wirkung von Silbernanopartikeln und die Erfassung möglicher Umweltrisiken. Es waren 17 verschiedene Partner aus den Bereichen Industrie, Forschung und Regulierungs- und Bundesbehörden beteiligt. Fragestellungen, die untersucht werden sollten, bezogen sich auf den Zustand und die Menge an Silbernanopartikeln, welche durch den Einsatz und Gebrauch dieser Partikel in die Umwelt, z.B. durch Waschwasser und Abrieb, eingetragen wird. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Silbernanopartikel in dieser Form und diesen Mengen Auswirkungen auf essenzielle Leistungen terrestrischer oder aquatischer Mikroorganismen haben und wie Modifikationen der Silbernanopartikel ihre Wirkung beeinflussen.

Das Hauptziel der Promotionsarbeit war es, eine Risikocharakterisierung für das Silbernanopartikel NM-300K aus dem Sponsorship Programme der Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) für den Klärschlamm Pfad zu erstellen. Es wurde der Gehalt an Silbernanopartikel in Klärschlamm ermittelt, der bei Nutzung des Klärschlammes auf landwirtschaftlichen Flächen zu einer Hemmung der

Bodenmikroorganismen führt. Gleichzeitig wurde auch der Gehalt an NM-300K in Böden ermittelt, bei dem es zu einer Wirkung auf die Bodenmikroorganismen kommt.

Zur Erstellung dieser Risikocharakterisierung wurde die Promotionsarbeit in drei Phasen unterteilt:

- (1) die Erstellung eines Grunddatensatzes zur Wirkung von NM-300K in Böden und Klärschlamm,
- (2) die Auswirkung von verschiedenen Abwasserkomponenten auf die Wirkung von NM-300K im Klärschlamm und
- (3) die Erstellung eines realistischen Nutzungsszenarios zur Aufbringung von silbernanopartikelhaltigem Klärschlamm als landwirtschaftlicher Dünger auf Böden.

## 2 Aktueller Kenntnisstand

### 2.1 Einsatz von Silbernanopartikeln

Silbernanopartikel bieten eine Vielzahl an Einsatzmöglichkeiten in den verschiedensten Produkten. Dies liegt vor allem an der antibakteriellen Wirkung hervorgerufen durch die Freisetzung von Silberionen und der daraus resultierenden Hemmung des Wachstums von Mikroorganismen.

Bei Silbernanopartikeln kann die antibakterielle Wirkung nicht nur durch die Ionenfreisetzung wie bei metallischem Silber erzielt werden. Für Silbernanopartikel (in einem Größenbereich von 1 – 10 nm) wurde gezeigt, dass es zu einer Anlagerung an die Zellmembran kommen kann, wodurch deren Funktionalität (Permeabilität, Respiration) gestört wird. Weiterhin können die Silbernanopartikel Schaden in der Zelle hervorrufen, indem eine Reaktion mit Schwefel und Phosphorverbindungen wie sie in der DNA vorliegen stattfindet. Die Wirkung der Silbernanopartikel wird zusätzlich durch die Freisetzung von Silberionen verstärkt (Morones et al. 2005). Hier gilt auch für Silbernanopartikel, dass aufgrund der größeren Oberfläche von kleineren Partikeln mehr Ionen freigesetzt werden. Dabei sind lokal erhöhte Konzentrationen an Silberionen nicht auszuschließen.

Es wird geschätzt, dass weltweit ca. 320 Tonnen Nanosilber pro Jahr produziert und genutzt werden (Gottschalk et al. 2009). Das Einsatzgebiet von Silbernanopartikeln umfasst die Luft- und Raumfahrttechnik, die Gesundheitspflege und verschiedene Verbrauchsgüter (Ahamed et al. 2010). Ebenso werden Silbernanopartikel in Lebensmittelverpackungen, den Innenbereichen von Automobilen und verschiedenen Baustoffen, die z.B. im Sanitärbereich von Wohnungen verwendet werden, genutzt (Blaser et al. 2008). Ein weiteres großes Feld, in dem Silbernanopartikel immer öfter angewendet werden, stellt die Medizin dar. Hier werden Silbernanopartikel z.B. auf Bandagen und auf die Oberfläche von neurochirurgischen Shunts und Kathetern aufgebracht. Auch in Knochenzement und Implantaten werden Silbernanopartikel aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung eingearbeitet (Chaloupka et al. 2010). Nach Angaben des „Inventory of Nanotechnology-based Consumer Products (Project on Emerging Nanotechnologies)“ werden derzeit Silbernanopartikel in mehr als 313 kommerziell vertriebenen Produkten genutzt. Dabei werden die Silbernanopartikel vorrangig in

Produkten der Gesundheitsvorsorge und in Fitnessprodukten eingesetzt, welche Körperpflege- und Kosmetikartikel genauso umfassen wie Kleidung und Sportbekleidung (Woodrow Wilson International Center for Scholars 2011).

Das Wachstum von Bakterien auf Textilien kann mit einer antibakteriellen Ausrüstung der Textilien, aber auch durch den Einsatz eines Biozids, eingearbeitet in synthetische Fasern während der Extrusion, vermindert werden. Textilien, die mit Silbernanopartikeln ausgestattet wurden, zeigten eine länger andauernde antibakterielle Wirkung. Die Produktion von Textilien mit antibakterieller Wirkung wurde auf 100000 Tonnen weltweit für das Jahr 2000 geschätzt, mit einer jährlichen Zunahme von mehr als 15% (Yuan und Cranston 2008). Neben den Textilien werden mittlerweile auch Waschmaschinen mit Silbernanopartikeln ausgestattet, die während des Waschprozesses freigesetzt werden und eine antibakterielle Wirkung erzeugen sollen (Farkas et al. 2011).

Mit steigendem Anwendungsbereich und einhergehendem Anstieg der Produktionsmenge an Silbernanopartikeln steigt gleichzeitig auch die Gefahr einer Freisetzung aus z.B. Kleidung nach mehrmaligem Waschen. Diese freigesetzten Silbernanopartikel werden unweigerlich in die Kläranlage gelangen.

## **2.2 Freisetzung von Silbernanopartikeln aus Textilien**

Am Beispiel der Textilien soll dargestellt werden, dass Silbernanopartikel aus Produkten wie z.B. Socken freigesetzt werden und somit den Weg in die Umwelt finden. Hierzu gibt es eine Reihe von Studien, die die Freisetzung im Verlauf des Waschvorganges von Textilien belegen. Es gibt drei Möglichkeiten, die Faser bei der Textilausrüstung mit Silber und entsprechend Silbernanopartikeln zu bestücken. Entweder wird die Faser von Silber komplett beschichtet, das Silber wird an der Faser angelagert oder in die Faser integriert. In 90% aller Anwendungen werden Textilien mit Silber veredelt (Beschichtung oder Anlagerung) und nur bei 10% wird Silber in die Faser integriert (Burkhardt et al. 2011).

Die Studie von Geranio et al. (2009) zur Freisetzung von Silbernanopartikeln unter Waschbedingungen (pH-Wert 10, Zugabe von Tensiden und Oxidationsmitteln) zeigt, dass ein Großteil der Silbernanopartikel, die aus Textilien freigesetzt wurden, in Fraktionen deren Bestandteile größer als 450 nm waren vorgefunden wurden. Die Autoren führen hierzu mechanische Beanspruchung an, was die Freisetzung von

Faserbestandteilen und –fragmenten mit Silber bedeutet. Jedoch waren 5 – 15% der freigesetzten Partikel immer noch im Bereich unter 100 nm vorzufinden. Die Auflösung der Silbernanopartikel wurde unter realistischen Waschbedingungen mit einem pH-Wert von 10 vermindert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Freisetzung und die Größe der Partikel abhängig von der Einarbeitung der Silbernanopartikel in die Faser waren.

Diese Ergebnisse werden von einer weiteren Studie zu diesem Thema gestützt, in der ebenfalls mehrere silbernanopartikelhaltige Textilien auf die Freisetzung der Partikel untersucht wurden. Diese Versuche wurden ebenfalls unter realistischen Waschbedingungen durchgeführt. Auch hierbei zeigte sich, dass die Silbernanopartikel aus Textilien freigesetzt wurden. Mikroskopische Untersuchungen ergaben, dass die Silbernanopartikel unter anderem als AgCl Nanopartikel, größere AgCl Partikel, nanopartikuläres Ag<sub>2</sub>S und metallische Silbernanopartikel wiederzufinden waren. Auch in dieser Studie besaß ein Großteil der freigesetzten Partikel (34 – 85%) eine Größe von mehr als 450 nm, wobei die Partikel zumeist als Agglomerate vorlagen (Lorenz et al. 2012).

In einer dritten Studie von Benn und Westerhoff (2008) zu dieser Thematik wurden die Ergebnisse der ersten beiden Studien bestätigt. Es wurden silbernanopartikelhaltige Strümpfe auf die Freisetzung der Partikel untersucht. Die Freisetzung wurde in dieser Studie nicht unter realistischen Waschbedingungen betrachtet. Die Experimente wurden mit destilliertem Wasser durchgeführt. Es zeigte sich auch hier, dass die Partikelgröße der freigesetzten Silbernanopartikel zwischen 10 – 500 nm lag. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl kolloidales als auch ionisches Silber aus den Strümpfen freigesetzt wurde. In dieser Studie wurde zusätzlich gezeigt, dass Klärschlamm auch hohe Konzentrationen des freigesetzten Silbers adsorbieren kann.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der drei Studien, dass Silbernanopartikel aus Fasern freigesetzt werden können. Ein geringer Anteil der freigesetzten Silbernanopartikel lag weiterhin als metallisches Nanosilber vor. Je nach Umgebungsmedium reagieren die freigesetzten Nanopartikel mit Chlorid- oder Sulfidionen. Unabhängig davon, mit welchen Komponenten des Umgebungsmediums die Partikel reagierten, besaßen auch diese eine Partikelgröße

von unter 100 nm. Zuletzt wurde gezeigt, dass Klärschlamm hohe Konzentrationen an freigesetztem Silber aufnehmen kann.

### 2.3 Verbleib von Silbernanopartikeln in der Kläranlage

Der Verbleib von Nanosilber soll in der Kläranlage dargestellt werden. Hierzu wurden verschiedene Studien zu diesem Thema zusammengefasst. Im Zusammenhang mit dieser Thematik zeigte sich in einer Studie von Tiede et al. (2010), dass in Batchversuche mit Klärschlamm nach sechs Stunden Kontaktzeit mehr als 90% der zugefügten Silbernanopartikel im Klärschlamm zu finden waren. Nur ca. 10% der Silbernanopartikel wurden in diesen Batchversuchen im Überstand gefunden. Die im Überstand vorgefundenen Silbernanopartikel besaßen nach wie vor ihre ursprüngliche Partikelgröße von 40 nm. Die Interaktion von Klärschlamm und Silbernanopartikeln wurde anhand der Ergebnisse zum einen damit erklärt, dass die Partikel an Klärschlamm adsorbieren. Zusätzlich wurden Fällungsreaktionen der von Silbernanopartikeln gebildeten Silberionen mit Chlorid, Sulfid und mit organischem Material in Betracht gezogen.

Kaegi et al. (2011) zeigten mit Hilfe von Modellkläranlagen, dass nach 43 Tagen Versuchsdauer nur 5% der Silbernanopartikel, die in die Denitrifikationsstufe eingeleitet wurden, im Auslauf wiederzufinden waren. 85% der Silbernanopartikel waren an den Klärschlamm sorbiert und weitere 5% waren nach wie vor in der Modellkläranlage zu finden. Zu Beginn des Versuchs war die Sorption der Silbernanopartikel an den Klärschlamm mit 90% noch einmal größer. Eine Studie von Shafer et al. (1998), die allerdings für Silber und nicht für Silbernanopartikel durchgeführt wurde, bekräftigt diese Ergebnisse. Hier wurde gezeigt, dass 92 – 99% der Einlaufkonzentration an Silber in der Kläranlage beseitigt wurden.

In der Studie von Kaegi et al. (2011) wurde zusätzlich gezeigt, dass die Silbernanopartikel an einen signifikanten Anteil an Schwefel gebunden sind. Es kommt sowohl im Klärschlamm als auch im Abwasser der Kläranlage zu einer nahezu kompletten Transformation von Silbernanopartikel mit dem vorhandenen Schwefel zu  $\text{Ag}_2\text{S}$ . Die Bildung von  $\text{Ag}_2\text{S}$  geht dabei in der Denitrifikationsstufe in weniger als zwei Stunden vonstatten. Diese Erkenntnisse werden von einer weiteren Studie von Kim et al. (2010) bekräftigt. Hier zeigte sich die Bildung von ellipsenförmigen  $\text{Ag}_2\text{S}$  Kristallen in Klärschlamm, die eine Partikelgröße von 5 – 20

nm aufwiesen und sehr kleine, lockere Aggregate bildeten. In dieser Studie wurde Klärschlamm genutzt, der aus einer Großstadtregion bezogen wurde und einen Ag-Gehalt von 856 mg/kg TS Klärschlamm aufwies.

Die hier aufgeführten Studien zeigen, dass Silbernanopartikel, die sich im Zulauf von Kläranlagen befinden, an den Klärschlamm adsorbieren. Die AgNP und die gebildeten Ag-Ionen reagieren sowohl mit dem Abwasser als auch im Klärschlamm vorrangig mit dem vorhandenen Sulfid und mit Chlorid. Es zeigt sich dabei, dass selbst Ag<sub>2</sub>S Kristalle weiterhin im nanopartikulären Maßstab vorliegen.

## 2.4 Einsatz von Klärschlamm als landwirtschaftlicher Dünger

In Deutschland fallen jährlich etwa zwei Millionen Tonnen Klärschlamm-trockensubstanz aus kommunalen Kläranlagen an. Die Klärschlammverwertung in der Landwirtschaft stagnierte in den letzten Jahren (2006 – 2010) mit einem Anteil von rund 30%, was an den steigenden Qualitätsanforderungen an die Klärschlämme liegt. Bundesländer wie Baden-Württemberg und Nordrhein-Westfalen verbrennen über 60% des in ihrem Bundesland anfallenden Klärschlammes. Eine überwiegende landwirtschaftliche Verwertung des Klärschlammes wird vor allem in den Bundesländern Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen, Rheinland-Pfalz und Schleswig-Holstein praktiziert. Die Klärschlammverwertung wird in Deutschland in der Klärschlammverordnung (AbfKlärV) geregelt, die momentan einer Novellierung unterzogen wird. Europaweit wird Klärschlamm intensiver auf landwirtschaftlichen Flächen genutzt. In großen Teilen Südeuropas (Spanien, Portugal, Frankreich) aber auch in Großbritannien und Irland werden zwischen 50 und 75% des Klärschlammes als landwirtschaftliche Dünger (Stand 2010) genutzt (Wiechmann et al. 2012).

Der Klärschlamm kann als Vielstoffgemisch bezeichnet werden und enthält eine ganze Reihe wichtiger Nährstoffe wie Phosphor, Stickstoff und Kalium. Im Rahmen der AbfKlärV werden Klärschlämme sehr gründlich auf Schadstoffe, wie z.B. Schwermetalle und organische Schadstoffe, untersucht. Trotz strenger Kontrollen wird die Untersuchung von Klärschlamm auf viele potentielle Schadstoffe wie z.B. Krankheitserreger, Mineralölkohlenwasserstoffe und letztlich auch Nanopartikel in der AbfKlärV nicht geregelt. Im Zuge der Novellierung der Klärschlammverordnung wurden neue Grenzwertvorschläge für organische Schadstoffe geprüft. Hierbei

wurden verschiedene, bekannte Schadstoffe in vier Kategorien eingeordnet. In die Kategorien 1- 3 wurden Schadstoffe eingeteilt, für die es bereits Grenzwerte gibt (z.B. PCB oder AOX), deren Grenzwerte neu geregelt werden müssen (z.B. PAK) und auch Schadstoffe, die eine hohe ökologische Relevanz haben, deren Konzentration in den letzten Jahren aber gesunken ist (z.B. TBT). Nanopartikel fallen bei dieser Einteilung in die letzte Kategorie 4 und erhalten weder einen Grenzwert, noch wird ein Monitoring vorgeschlagen (Bergs 2010).

### 3 Strukturierung der Arbeit

Ziel ist es, eine kurze Übersicht über den Aufbau der Arbeit zu geben. Abbildung 1 stellt hierzu die Struktur, nach der die Arbeit angefertigt wurde, dar. Das Ziel der Arbeit ist, abschließend eine Risikocharakterisierung zum Klärschlammfad für NM-300K durchzuführen.

Um dieses Ziel zu erreichen, musste zunächst ein Grunddatensatz zur Wirkung von NM-300K im terrestrischen Ökosystem und in der Kläranlage erstellt werden. Hierfür wurde die Wirkung von NM-300K auf Organismen verschiedener Trophieebenen des terrestrischen Ökosystems (Mikroorganismen, Kompostwürmer, Pflanzen) ebenso untersucht wie die Wirkung und der Verbleib von NM-300K in der Kläranlage. Die Untersuchungen wurden nach standardisierten Richtlinien der OECD und ISO durchgeführt. Neben NM-300K wurde in allen Versuchen auch  $\text{AgNO}_3$  mit untersucht, um herauszufinden, ob die Wirkung, die NM-300K auf die einzelnen Organismen in Böden hat, auf freigesetzten Ionen oder Partikeleigenschaften wie der Größe des Partikels beruhen.

Auf Grundlage des entstandenen Datensatzes wurde im Anschluss detaillierter der Einfluss verschiedener Abwasserkomponenten auf die Wirkung von NM-300K betrachtet. Hierzu wurde der Atmungshemmtest nach OECD Richtlinie 209 genutzt, der einen Screening-Versuch zur Wirkung von Chemikalien auf die Mikroorganismen des Klärschlammes darstellt. Es wurden verschiedene Veränderungen der Abwasserzusammensetzung, des pH-Wertes, aber auch die Zugabe von Komplexbildnern, Waschwasser und AgNP-haltigen Fasern mit Hilfe dieses Versuchs untersucht. Auf Basis dieser Untersuchungen wurde festgestellt, wie die Wirkung von NM-300K auf die Mikroorganismen des Klärschlammes durch Veränderungen des Umgebungsmediums gesteuert wird. Zusätzlich sollten anhand dieser Ergebnisse Aussagen über die Stabilität der Abbauleistung der Mikroorganismen in Klärschlamm getroffen werden.

Ein weiteres Ziel war es, durch den Vergleich der Ergebnisse von NM-300K im Atmungshemmtest mit denen der Kläranlagensimulationen zu erfahren, ob Ergebnisse aus dem Atmungshemmtest für NM-300K auch direkt auf Kläranlagen übertragbar sind, oder ob dieser Versuch mehr oder weniger empfindlich ist.

Klärschlamm wird oftmals als Dünger auf landwirtschaftlichen Flächen genutzt. Aus früheren Studien war bekannt, dass Silber in der Kläranlage an den Klärschlamm adsorbiert. Unter der Annahme, dass dies auch für Silbernanopartikel gilt, bestand die Aufgabe festzustellen, welche Wirkung die Silbernanopartikel auf Organismen des terrestrischen Ökosystems (Bodenmikroorganismen, Kompostwürmer, Pflanzen) haben würde. Es wurde eine Versuchsreihe erstellt, in der Klärschlamm auf zwei unterschiedliche Arten mit NM-300K beladen wurde. Der Klärschlamm wurde aufgearbeitet und entsprechend der AbfklärV in Versuchsböden eingearbeitet. Auf diese Weise wurde eine Alterung und Umsetzung des Klärschlammes in Böden simuliert und es wurde gemessen, ob verschiedene Organismen durch NM-300K beeinflusst wurden. Hierzu wurden zu fünf Zeitpunkten über 140 bis 180 Tage die verschiedenen Versuche, die auch ohne Klärschlamm zur Erstellung des Grunddatensatzes genutzt wurden, angewendet.

Auf Grundlage gewonnener Daten zur Wirkung von NM-300K im terrestrischen Ökosystem, zum Verbleib und zur Wirkung in Klärschlamm und zur Wirkung in den durchgeführten Langzeitversuchen über 140 bis 180 Tage wurde dann eine Risikocharakterisierung durchgeführt.

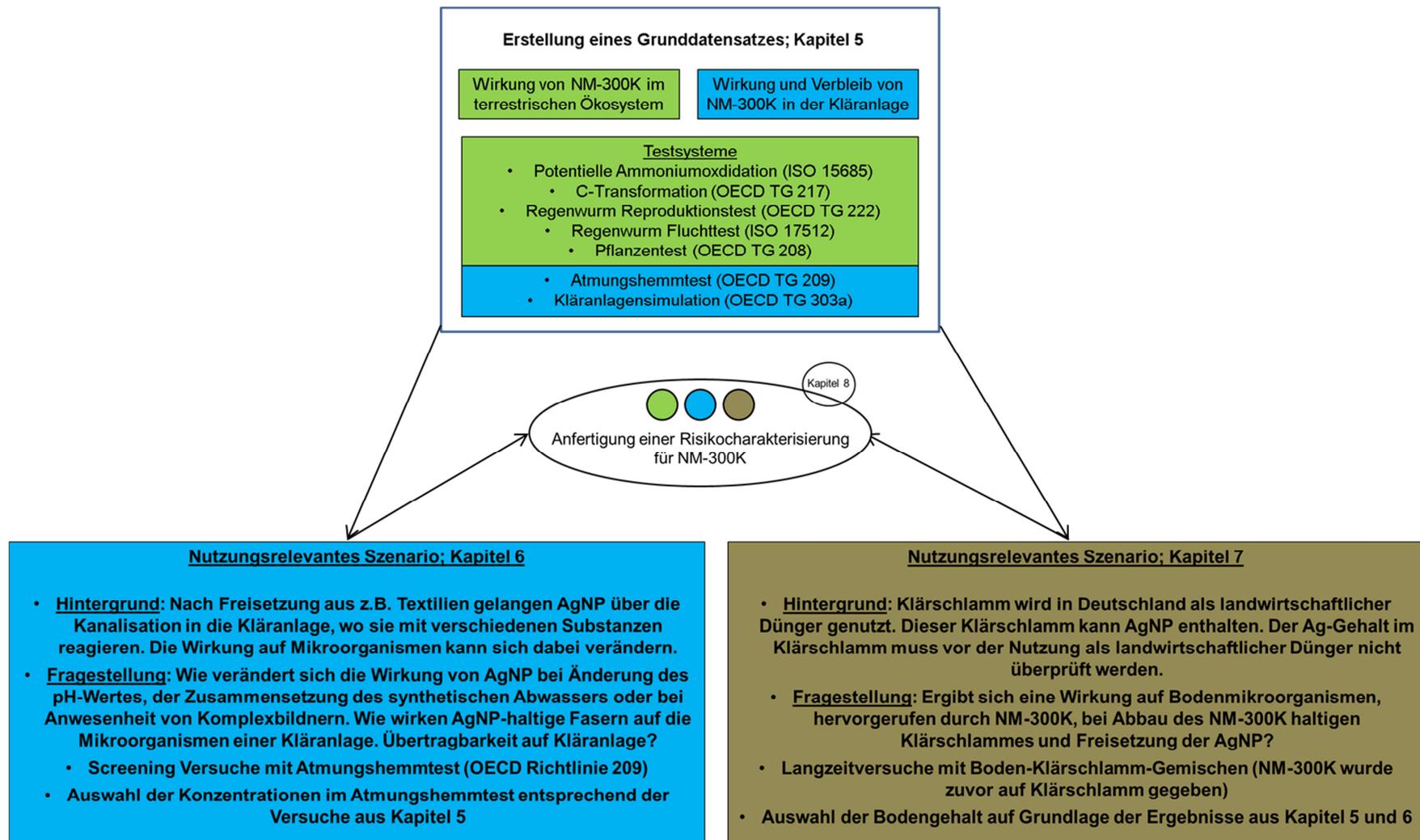


Abbildung 1: Strukturierung der Arbeit

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

#### 4.1.1 Nanopartikel NM-300K

Als nanopartikulärer Testgegenstand in allen Versuchen wurde NM-300K aus dem OECD Sponsorship Programme untersucht.

Die spezifischen Eigenschaften wie Partikelgrößenverteilung, Stabilität etc. dieses Materials wurden im Rahmen des OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN) Sponsorship Programme am Joint Research Center (JRC) und einer Reihe anderer Institute untersucht. NM-300K stellt somit eines der am Besten charakterisierten Silbernanopartikel dar. In dem Bericht „NM-Series of Representative Manufactured Nanomaterials – NM-300 Silver – Characterisation, Stability and Homogeneity“ wurden die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst. Zu beachten ist, dass an die ersten untersuchten Proben das Label NM-300 vergeben wurde, während weitere Proben den Zusatz „K“ erhielten. Die Ergebnisse, die für NM-300 dargestellt wurden, gelten auch für NM-300K.

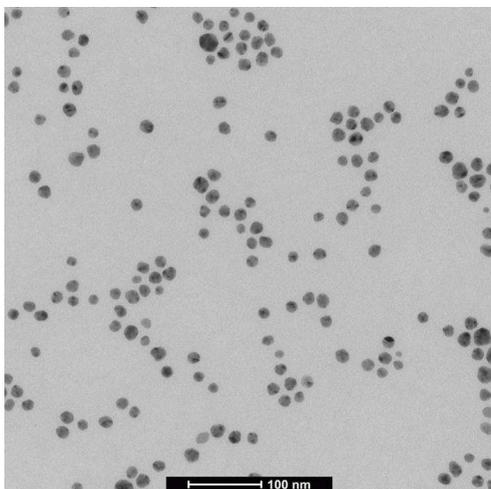


Abbildung 2: TEM Aufnahme von NM-300K in Reinstwasser; Micrographs made by the EM-service of CODA-CERVA (Belgium)

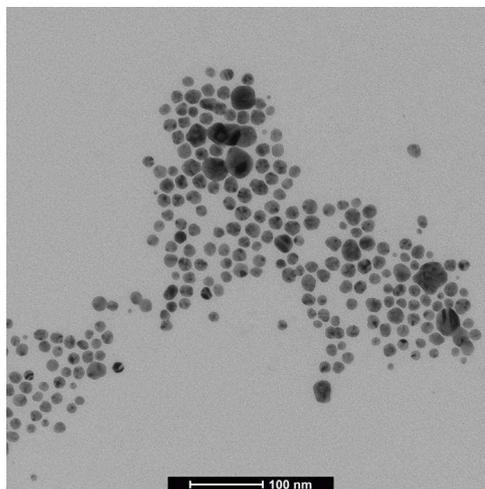


Abbildung 3: TEM Aufnahme von NM-300K in OECD Algenmedium; Micrographs made by the EM-service of CODA-CERVA (Belgium)

In Abbildung 2 sind TEM Aufnahmen von NM-300K in Reinstwasser, in Abbildung 3 in OECD Algenmedium dargestellt. NM-300 besitzt eine enge Partikelgrößenverteilung von 99% bei einer Partikelgröße von 15 nm. Mit Hilfe von

hochauflösenden TEM Aufnahmen wurde eine zweite, wesentlich kleinere Verteilung von Partikeln mit einer Größe von 5 nm gefunden. Der Silbergehalt und die Anzahl der Partikel waren über die Dauer der Untersuchungen bis zu 12 Monate stabil. In einer polyakrylen Matrix wurden von NM-300 Silberionen bis zu einer Konzentration von unter 0,01 w/w% freigesetzt (Klein et al. 2011).

NM-300 hat bei einer Temperatur von 20°C einen pH-Wert von  $7,2 \pm 0,3$  einen Siedepunkt von  $102 \pm 2^\circ\text{C}$  und eine Dichte von  $1,2 \pm 1 \text{ g/mL}$ . Es handelt sich bei NM-300 um eine orange-braune Flüssigkeit.

#### **4.1.2 Dispersant NM-300K DIS**

NM-300K besteht aus einer Mischung eines Dispersanten, NM-300K DIS, und dem entsprechenden AgNP Anteil von 10,16 w/w%. NM-300K DIS enthält jeweils 4 w/w% eines Polyoxyethylen Glycerol Triolates und Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurates (Tween-20).

#### **4.1.3 Referenzmaterial Silbernitrat**

Es wurde Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) der Firma Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Das verwendete Silbernitrat hat die CAS Nummer 7761-88-8, lag in kristalliner Struktur und als reines Material vor. Die Löslichkeit in Wasser lag bei einer Temperatur von 20°C bei 2160 g/L. Silbernitrat hatte eine molare Masse von 169,87 g/mol. Alle dargestellten Versuche in denen  $\text{AgNO}_3$  getestet wurde, wurden mit einer Charge (Charge/Lot: K40904010 026) durchgeführt.

#### **4.1.4 Flockungsmittel**

In den Versuchen mit Klärschlamm wurde zum Eindicken bzw. Entwässern des Schlammes das kationische Polyacrylamid SEDIFLOC 154 (3F Chimica Deutschland GmbH, Burgthann-Oberferrieden, Deutschland) als Flockungsmittel genutzt. Das Flockungsmittel wurde von der kommunalen Kläranlage in Schmallenberg als eine klare Emulsion, vorverdünnt auf eine 2%ige Lösung, bezogen. Die Zugabe des Flockungsmittels erfolgte strikt nach den Angaben der Kläranlage und konnte in Abhängigkeit von Trockensubstanzgehalt und Zusammensetzung des Klärschlammes leicht variieren.

### 4.1.5 Textilfasern

Auf Basis des realistischen Nutzungsszenarios wurden verschiedene Textilfasern im Atmungshemmtest untersucht. Diese Fasern waren mit unterschiedlichen Silbernanopartikeln in verschiedenen Konzentrationen beladen und wurden von den Projektpartnern des Projekts „Umsicht“ zur Verfügung gestellt. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Fasern.

**Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Textilfasern im Atmungshemmtest**

Produktname	Fasermaterial	Silberquelle	Silbergehalt [%]; Silbergehalt bei Zugabe von 1 g Faser
<b>SAP-Faser (Kontrolle)</b>	Cellulose > 80%; 11% Polyacrylat	unbeladen	-
<b>V1946</b>	Cellulose 99,975%	NM-300K	0,025%; 0,5 mg/L
<b>V1947</b>	Cellulose 99,95%	NM-300K	0,050%; 1,0 mg/L
<b>OMPG 1</b>	Cellulose 99,924%	Biogate, MicroSilver BG™; 80 – 140 nm	0,076%; 0,152 mg/L
<b>OMPG 2</b>	Cellulose 98,0%	NM-300K	2,0%; 40 mg/L
<b>Smartcel™ bioactive (Smartfiber AG)</b>	SAP – Faser; 11% Polyacrylat	AgNO <sub>3</sub>	5 – 8%; ~ 130,0 mg/L

## 4.2 Testorganismen

### 4.2.1 Bodenmikroflora

Der Referenzboden RefeSol 01A wurde als Versuchsboden und Trägermaterial bei Applikationen verwendet. RefeSol 01A ist ein schwach lehmiger Sand, mittel sauer und sehr schwach humos. Tabelle 2 enthält einen Überblick über die spezifischen Eigenschaften, die in den OECD Richtlinien für terrestrische Testverfahren (z.B. Versuche mit Pflanzen und Bodenmikroorganismen) gefordert werden. RefeSol 01A wurde auf Beprobungsflächen bei Hannover entnommen und entsprechend der guten langwirtschaftlichen Praxis in Edelstahlboxen gelagert. Während der Lagerung wurde Klee angepflanzt und bei dem Anbau des Klees wurden keine Pestizide genutzt.

Die benötigten Mengen an Boden wurden ein bis vier Wochen vor Versuchsbeginn aus den Edelstahlboxen entnommen. Eine TM-Bestimmung wurde durchgeführt und der Boden wurde bei Raumtemperatur auf eine  $WHK_{max}$  von 20 – 30% heruntergetrocknet. Im Anschluss wurde der Boden  $\leq 2$  mm gesiebt. Startete der Versuch nicht unmittelbar nach dem Sieben, wurde der Boden im Dunkeln bei 4°C gemäß der ISO Richtlinie 18512 (2007) gelagert.

**Tabelle 2: Physikalisch-chemische Eigenschaften (Refesol 01A)**

Physikalisch-chemische Bodeneigenschaften	RefeSol 01A
pH [in 0,01M CaCl <sub>2</sub> ]	5,67
C <sub>org</sub> [%]	0,93
N <sub>gesamt</sub> [mg/kg]	882
KAK <sub>eff</sub> [mmolc/kg]	37,9
Sand [%]	71
Schluff [%]	24
Ton [%]	5
WHK <sub>max</sub> [mL H <sub>2</sub> O/kg TM Boden]	227

#### 4.2.2 Kompostwurm *Eisenia andrei*

In den Versuchen mit Würmern wurde jeweils der Kompostwurm *Eisenia andrei* (Andre 1963), der schon seit mehr als 15 Jahren am Fraunhofer IME kultiviert wird, genutzt. Die Würmer werden unter definierten Bedingungen gezüchtet. Sie werden in einer Mischung aus Kuhdung und Sphagnumtorf (Verhältnis 1:1), bei einer Temperatur von 20°C  $\pm$  2°C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 Stunden (~ 700 Lux) herangezogen. Drei Tage vor jedem Versuch wurden Tiere mit einem Frischgewicht zwischen 250 und 600 mg aus den Zuchtgefäßen herausgesucht. Diese Tiere wurden an den Versuchsboden (RefeSol 01A) mit den entsprechenden Versuchsbedingungen (55%  $WHK_{max}$ ) adaptiert. Es wurde eine ausreichende Menge an Futter in den Boden eingearbeitet, um einen Gewichtsverlust durch Stress zu verhindern. In den Versuchen wurden Tiere verwendet, die ein Clitellum und ein

Frischgewicht von 250 – 600 mg aufwiesen. Bei der Durchführung eines Regenwurm Fluchttests veränderte sich die Spanne des Frischgewichtes der Würmer von 250 – 600 mg auf 300 bis 600 mg.

#### 4.2.3 Pflanzensamen

In den Versuchen mit Pflanzen wurde das Wachstum der Bohne (*Phaseolus aureus* L.) und des Hafers (*Avena sativa* L.) untersucht. Die Samen der Bohne wurden von Carl Sperling und Co. in Lüneburg, die des Hafers von der Raiffeisen Genossenschaft Nordwest eG in Schmallenberg bezogen.

#### 4.2.4 Klärschlamm

Bei Versuchsstart wurde jeweils am Morgen frischer Klärschlamm aus der kommunalen Kläranlage in Schmallenberg entnommen. Eine Untersuchung des Klärschlammes auf seinen Gesamtsilbergehalt wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine vorherige Kontamination des Klärschlammes mit Silber zu Grunde lag. Mit Hilfe der ICP-OES Messung wurde ein Silbergehalt von 2,3 mg Ag/kg TS Klärschlamm ermittelt. Zusätzlich wurden die relevanten, in der AbfKlärV genannten Grenzwerte für Metalle quantifiziert. Die Ergebnisse der Messungen und ein Vergleich mit den Grenzwerten der AbfKlärV sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Der pH-Wert des Klärschlammes wurde in der Kläranlage auf 6,7 – 7,0 eingestellt. Da sich der Klärschlamm zum Großteil aus häuslichem Abwasser zusammensetzt, wurden die Bestandteile an PCB, PCDD und PCDF, wie in der AbfKlärV vorgesehen, nicht untersucht.

**Tabelle 3: Grenzwerte der AbfKlärV für die Nutzung von Klärschlamm sowie die in dem verwendeten Klärschlamm gemessenen Gehalte**

Element	Ag	Pb	Cd	Cr	Cu	Ni	Hg	Zn	AOX
<b>Grenzwerte [mg/kg TS <sup>a</sup>]</b>	-	900	10	900	800	200	8	2500	500
<b>Gehalt [mg/kg TS <sup>a</sup>]</b>	2,3	59,5	1,1	43,7	484,0	32,3	-	841,5	-
<b>Stabw. <sup>b</sup></b>	0,2	5,8	0,1	1,4	98,3	4,2	-	74,1	-

<sup>a</sup> Trockensubstanz Klärschlamm; <sup>b</sup> Standardabweichung

### 4.3 Applikationsmethodik

#### 4.3.1 Herstellung der Stammsuspensionen

Im Rahmen der Beteiligung am Projekt „UMSICHT“ (Bundesministerium für Bildung und Forschung 2010 - 2013) war die TU Dresden damit beauftragt, eine geeignete „Standard Operating Procedure“ (SOP) zur Herstellung einer geeigneten NM-300K Suspension zu erstellen. Mit dieser SOP sollte eine standardisierte Vorgehensweise bei der Herstellung der Stammsuspension und bei der Testung von NM-300K gewährleistet werden. Nach Fertigstellung der SOP wurde die Stammsuspension gemäß der SOP „Empfehlung zur Herstellung und Handhabung von Silbernanopartikel-Suspensionen“ (Technische Universität Dresden 2011) hergestellt. Hierbei wurde in eine Flasche mit 2 mL NM-300K 8 mL destilliertes Wasser gegeben. Die verschlossene Flasche wurde kurz geschüttelt und dann für 15 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Nach Herstellung der Stammsuspension wurde diese sofort genutzt. Nicht genutzte Stammsuspension wurde entsorgt. Um den Vergleich zwischen Effekten, ausgelöst durch Partikel und durch freigesetzte Ag-Ionen, ziehen zu können, wurde als Referenz jeweils auch  $\text{AgNO}_3$  untersucht. Entsprechend wurde auch hier vor Versuchsbeginn eine Stammlösung angesetzt. Vor der Applikation von  $\text{AgNO}_3$  in den jeweiligen Versuch wurde eine Stammlösung von 1 g/L mit destilliertem Wasser hergestellt.

#### 4.3.2 Applikation des Testgegenstandes auf den Versuchsboden

Bei der Applikation der Stammsuspension von NM-300K auf den Versuchsboden wurde 5% der Bodenmenge, die für den Testansatz zur Verfügung stand, luftgetrocknet. Dieser Boden wurde als Trägermaterial für die Applikation von NM-300K genutzt. Das Trägermaterial wurde mit der entsprechenden Menge an NM-300K versetzt, um die jeweilige Zielkonzentration im Gesamtansatz zu erreichen. Das Gemisch aus NM-300K und Trägermaterial wurde mit einem kleinen Laborlöffel vermischt, bis optisch eine homogene Verteilung erreicht wurde. Die restlichen 95% des Versuchsbodens wurden auf einem Blech ausgebreitet. Der Versuchsboden hatte eine  $\text{WHK}_{\text{max}}$  von 20% bis 30%. Das Trägermaterial mit NM-300K wurde auf dem Versuchsboden verteilt und mit einer Kelle solange umgearbeitet, bis eine homogene Verteilung gewährleistet war. Im Anschluss wurde destilliertes Wasser mit

einer Sprühflasche auf den Boden aufgetragen bis eine  $WHK_{\max}$  von 55% erreicht wurde und dann noch einmal umgearbeitet.

Die Applikation von  $AgNO_3$  auf den Versuchsboden wurde vergleichbar mit der von NM-300K durchgeführt. Ziel war es, eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Messungen des Gesamt Ag-Gehaltes im Boden in mehreren Teilproben bei verschiedenen Versuchen zeigen, dass mit der angewandten Methodik eine sehr gute Homogenität der Verteilung von NM-300K /  $AgNO_3$  im Boden erreicht wurde.

#### 4.4 Ökotoxikologische Testverfahren

##### 4.4.1 C-Transformation (OECD Richtlinie 217)

###### Substrat induzierte Atmung

Die Versuche zur Bodenatmung wurden gemäß der OECD Richtlinie 217 (2000) durchgeführt. Nach der Zugabe eines Substrates (Glukose oder Glukose-Talkum) wird die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen gemessen. Die Validität des Versuchs ist gewährleistet, wenn der Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle  $\leq 15\%$  ist. Zur Messung der Atmungsaktivität wurde das Sensomat-System OxiTop der Firma Aqualytic mit dem PC Programm „Achat OC“ genutzt. Die Sensomatmessung ist eine Druckdifferenzmessung, wobei das Messsystem Änderungen des Luftdrucks in den Testgefäßen erfasst. Das entstehende Kohlendioxid wird durch hochkonzentriertes Kaliumhydroxid (KOH) gebunden und beeinflusst das Testsystem nicht. Sauerstoff wird in den Testgefäßen durch die Mikroorganismen verbraucht, so dass ein Unterdruck entsteht, der von dem Messsystem erfasst wird. Da der Luftdruck und auch die mikrobielle Aktivität in einem geschlossenen System von der Temperatur abhängt, muss die Inkubationstemperatur während der Messung konstant gehalten werden.

Der Versuch wurde bei  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  über 24 Stunden in einem geschlossenen Inkubationsschrank ohne Lichtquelle durchgeführt. An den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten wurden 100 g TM aus den Replikaten entnommen und in eine 500 mL Schott Duran Flasche gefüllt. Bei den Versuchen wurde im Anschluss 0,4 g Glukose zusätzlich in die Flasche gefüllt und per Hand durch Schütteln

homogen verteilt. Das OxiTop System wurde auf die 500 mL Flasche gesetzt und vor dem Anbringen der Messköpfe wurden 2 mL 45%ige KOH in das System gefüllt.

Für eine Inkubation bei 20°C (293,15 K) kann, zur Umrechnung der Rohdaten, die mit dem OxiTop Messsystem produziert wurden, für 100 g TM ein Faktor zur Angabe in mg O<sub>2</sub>/kg TM von 7 genutzt werden (Robertz et al. 1999). Hierbei wird mit der durchschnittlichen Dichte eines Ackerbodens gerechnet.

### Basalatmung

Die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen ohne Substratzugabe wurde in Versuchen mit Boden-Klärschlamm-Gemischen bestimmt. Hier wird die reine Bodenatmungsaktivität überprüft, es erfolgte keine Zugabe eines Substrates.

Die Atmungsrate sollte bis zum Auftreten von konstanten Raten gemessen werden. Für sandige Böden hat sich ein Zeitraum von sieben Tagen bewährt. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde die Dauer der Versuchsdurchführung bei allen Versuchen auf sieben Tage festgelegt. Die Versuche und die Berechnungen wurden wie bei der durch Substratzugabe induzierten Atmung durchgeführt. Für die Messungen wurde das Sensomat-System OxiTop der Firma Aqualytic mit dem PC Programm „Achat OC“ genutzt.

#### **4.4.2 Potentielle Ammoniumoxidation (ISO 15685)**

Die potentielle Ammoniumoxidation wurde gemäß der ISO Richtlinie 15685 (2004) durchgeführt. Die Ammoniumoxidation ist der erste Schritt bei der autotrophen Nitrifikation in Böden. Den Testorganismus stellen hier die nitrifizierenden Mikrobenpopulationen im Boden dar. Es wurde die Geschwindigkeit der Nitritbildung einer aufgeschlammten Probe bei gleichzeitiger Unterdrückung der Weiteroxidation zu Nitrat mit Natriumchlorid bestimmt. Die Menge an Natriumchlorid wurde so bemessen, dass die biologische Nitratbildung unterbunden wurde, die Zugabe aber keine negativen Auswirkungen auf die Ammoniumoxidation hatte. Die Validität des Versuchs ist gewährleistet, wenn der Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle  $\leq 15\%$  ist. Die Konzentration an Nitrit in den Proben wurde an einem Cary 300 Scan UV-Visible Spectrophotometer (Varian GmbH, Darmstadt, Deutschland) bestimmt.

25 g TM der jeweiligen Ansätze wurden am Abend vor Versuchsbeginn in 250 mL Glas-Erlenmeyerkolben eingewogen. Die Erlenmeyerkolben wurden mit einem Stopfen aus Watte verschlossen und bei 20°C in einen Inkubationsschrank gestellt. Am Morgen des Versuchs wird ein Prüfmedium aus Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ ), Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ ), Natriumchlorat ( $NaClO_3$ ) und Diammoniumsulfat ( $(NH_4)_2SO_4$ ) hergestellt. 100 mL des Prüfmediums, abzüglich des Wassergehaltes der feuchten Bodenprobe, werden auf die Probe gegeben. Die Probe wird bei  $25^\circ C \pm 2^\circ C$  und 175 rpm über die Dauer des Versuchs kontinuierlich geschüttelt. Eine Eichreihe mit Natriumnitrit wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 – 0,8  $\mu g$  N/mL hergestellt. Zusätzlich wurden noch zwei Lösungen zur Auslösung der Farbreaktion bei Anwesenheit von Nitrit angesetzt. Die Probenahme erfolgt nach zwei und sechs Stunden, wobei jeweils 10 mL Probe entnommen und mit 10 mL einer vier molaren KOH-Lösung versetzt wurden. Im Anschluss wurden die Proben über Faltenfilter (Whatman 597 1/2, Whatman GmbH, Dassel, Detuschland) gegeben. Je 5 mL des Filtrates und der Eichreihe wurden mit den Reagenzien zur Färbung der Probe vermischt. Im Anschluss folgte eine Inkubationszeit der Proben von 30 Minuten. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Konzentration an Nitrit in den Proben bestimmt.

#### 4.4.3 Mikrobielle Bodendiversität (ISO/TS 22939)

Die Bestimmung der mikrobiellen Bodendiversität wurde gemäß der ISO/TS Richtlinie 22939 (2010) durchgeführt. Dies ist ein Verfahren zur Aktivitätsbestimmung bestimmter Enzyme in Bodenproben, die mit fluorogenen Substanzen suspendiert und inkubiert werden. In Tabelle 4 wurden die verwendeten fluorogenen Substanzen zur Messung der Enzymaktivität aufgeführt. Die Messungen wurden nach Anhang A „Anleitung zur Verwendung frisch angesetzter Substratlösungen“ der ISO/TS Richtlinie 22939 (2010) durchgeführt. Vorteil der Durchführung nach Anhang A ist, dass mit frisch hergestellten Substratlösungen keine Einrichtung zur Gefriertrocknung der Lösungen benötigt wird. Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Synergy MX (BioTek Germany, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm durchgeführt.

Bei der Vorbereitung des Versuchs wurde 1 g TM Boden, der zu untersuchenden Bodenprobe, zu 100 mL sterilem ultra-high-quality (UHQ) Wasser hinzugegeben und

anschließend für drei Minuten in einem Eisbad mit einem Homogenisator bei 9600 rpm pro Minute homogenisiert. Die Probe wurde auf ein Endvolumen von 200 mL aufgefüllt. Zur Durchführung des Versuches werden verschiedene Pufferlösungen benötigt, die am Tag des Ansatzes vor Versuchsbeginn vorbereitet wurden. Die Auswahl der benötigten Pufferlösungen hängt stark von dem pH-Wert der jeweiligen Bodenprobe ab, welcher die Enzymaktivität beeinflusst. In dieser Arbeit wurden zur Messung der mikrobiellen Bodendiversität sowohl der 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) Puffer mit einem pH-Wert von 6,1, als auch der Trizma-Puffer mit einem pH-Wert von 7,8 genutzt. Der MES-Puffer wurde verwendet, um die Enzymaktivität der Phosphatase und der am Kohlenstoffkreislauf beteiligten Enzyme optimal zu fördern. Der MES-Puffer ist somit für Substrate geeignet, die 4-Methylumbelliferyl-phosphat (MUF) als fluoreszierende Verbindung enthalten. Der Trizma-Puffer soll wiederum die Aminopeptidaseaktivität fördern und ist für Substrate geeignet, die 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) als fluoreszierende Verbindung enthalten. Die Pufferlösungen wurden am Vortag des Versuchs angesetzt und für 20 Minuten bei  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  autoklaviert.

Bei der Herstellung der Substratlösungen, wurden diese mit einer Konzentration von 1 mmol/L angesetzt. Die MUF-Substratlösung wurde mit MES-Pufferlösung, die AMC-Substratlösung mit Trizma-Pufferlösung jeweils 1:10 verdünnt. Es wurden außerdem Standardlösungen für MUF und AMC in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Die Standards wurden in DMSO gelöst und auf 5 mmol / L konzentriert und durch Verdünnung mit MES- bzw. Trizma-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{mol} / \text{L}$  verdünnt. Für eine Probenreihe wurde die Standardlösung nach Vorschrift auf einmal hergestellt. Es wurde eine Konzentrationsreihe von 0 / 0,5 / 1,0 / 2,5 / 4,0 und 6,0  $\mu\text{mol} / \text{L}$  hergestellt. Zur Berücksichtigung der Fluoreszenzlöschung wurden für jedes Substrat 100  $\mu\text{L}$  Pufferlösung mit 100  $\mu\text{L}$  Substrat gemischt.

In 96-well Mikrotiterplatten (96F nontreated white microwell, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) wurden jeweils 50  $\mu\text{L}$  Bodensuspension und 50  $\mu\text{L}$  autoklavierte Pufferlösung (MES oder Trizma) in jedes „well“ der Mikrotiterplatten pipettiert und anschließend 100  $\mu\text{L}$  der Substratlösung hinzugegeben. Eine Fluoreszenzmessung wurde unmittelbar nach Zugabe der Proben in die Kavitäten als Nullwertmessung durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden für drei Stunden bei  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  unter

kontinuierlichem Schütteln bei ca. 700 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde erneut die Fluoreszenz in den Mikrotiterplatten gemessen.

**Tabelle 4: Fluorogene Substanzen zur Messung der Enzymaktivität**

Enzym	Substrat	Element	Abgebautes Makromolekül
$\beta$ -Glucosidase	4-MUF- $\beta$ -D-glucopyranosid	Kohlenstoff	Cellulose
Chitinase	4-MUF-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid	Kohlenstoff	Abbau von Chitin durch Aufspaltung von $\beta$ -1-4-glycosidischen Bindungen zu N-acetyl-glucosaminid und Chitobiose
Phosphodiesterase	bis-(4-MUF)-phosphat	Phosphor	Hydrolyse von Phosphatdiestern
Phosphomonoesterase	4-MUF-phosphat	Phosphor	Hydrolyse von Phosphatestern
Leucin-aminopeptidase	L-Leucin-AMC	Stickstoff	Hydrolyse von Oligopeptiden $\rightarrow$ Aminosäuren
Alanin-aminopeptidase	L-Alanin-AMC	Stickstoff	Hydrolyse von Oligopeptiden $\rightarrow$ Aminosäuren

#### 4.4.4 Regenwurm Reproduktionstest (OECD Richtlinie 222)

Der Regenwurm Reproduktionstest wurde bei allen Versuchen gemäß OECD Richtlinie 222 (2004) durchgeführt. Demnach ist es erlaubt entweder *Eisenia fetida* oder *Eisenia andrei* als Testorganismus zu nutzen. In allen Versuchen wurde mit *Eisenia andrei* gearbeitet (4.2.2). In diesem Zusammenhang wurden die ökotoxikologischen Endpunkte der Mortalität und der Entwicklung der Biomasse der adulten Tiere über einen Zeitraum von 28 Tagen und die Anzahl der aufkommenden Jungtiere nach 56 Tagen betrachtet. Der Versuch erfüllte die Validitätskriterien, wenn in jedem Replikat der Kontrollen  $\geq 30$  Juvenile vorhanden sind, der Variationskoeffizient der Reproduktion  $\leq 30\%$  und die Mortalität der adulten Tiere nach einer Dauer von 28 Tagen  $\leq 10\%$  beträgt.

Drei Tage vor Versuchsbeginn wurden Würmer mit einem Gewicht zwischen 250 und 600 mg Frischmasse aus der institutseigenen Zucht gesucht und in unbelasteten Versuchsboden unter Testbedingungen (Temperatur:  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; Beleuchtung: Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 Stunden) akklimatisiert. Kuhdung diente als Futter für die Würmer, um einem Gewichtsverlust der Würmer entgegenzuwirken. Der Kuhdung wurde von einem Biobauernhof bezogen und war frei von Antibiotika. Vor den Versuchen wurde der Kuhdung getrocknet und grob gemahlen. Am Ansatztag

des Versuchs wurde er zur besseren Wasseraufnahme nochmals mit einer Kaffeemühle fein gemahlen. Vor der Nutzung wurde der Kuhdung im Verhältnis 1:3 mit Wasser gemischt und für mindestens eine Stunde zum Quellen stehen gelassen.

Zu Beginn des Versuchs wurde der Versuchsboden in Gefäße aus Polypropylen (Bellaplast GmbH, Alf, Deutschland) mit einer Höhe von ~5 cm und eine Trockenmasse von 625 g Boden (55% WHK<sub>max</sub>) eingewogen. 40 g frischer Kuhdung wurde auf der Oberfläche des Versuchsbodens verteilt. Die Gefäße wurden über Nacht unter Testbedingungen stehen gelassen, damit sich ein Gleichgewicht in den Gefäßen einstellen konnte.

Am nächsten Tag wurden jeweils 10 Würmer mit einem Frischgewicht von 250 bis 600 mg auf die Oberfläche des Versuchsbodens gegeben. Das Ausgangsgewicht der Würmer wurde für jedes Gefäß einzeln dokumentiert. Die Gefäße wurden mit Deckeln aus Polypropylen mit Belüftungslöchern abgeschlossen, um eine Flucht der Tiere zu verhindern. Die Testgefäße wurden bei einer Temperatur von 20°C ± 2°C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 Stunden (~700 Lux) unter standardisierten Bedingungen inkubiert. Einmal pro Woche wurde der Wassergehalt in jedem Gefäß gravimetrisch überprüft und der Wasserverlust ausgeglichen. Zusätzlich wurde 20 g Futter neu auf der Oberfläche verteilt.

Nach 28 Tagen wurden die adulten Würmer aus den Testgefäßen entnommen, gezählt und die Mortalität, verursacht durch den Testgegenstand, festgestellt. Das Gewicht der Würmer wurde erneut dokumentiert, um die Veränderung der Biomasse zu untersuchen. Nach insgesamt 56 Tagen wurde die Anzahl der Juvenilen in den einzelnen Testgefäßen gezählt, um Einflüsse der Testsubstanz auf die Reproduktion der Würmer zu kontrollieren.

#### **4.4.5 Regenwurm Fluchttest (ISO 17512-1)**

Der Regenwurm Fluchttest wurde gemäß ISO Richtlinie 17512-1 (2008) durchgeführt. Hierbei wurde ebenso wie im Reproduktionstest *Eisenia andrei* als Testorganismus genutzt. Es wurde untersucht, ob die Würmer in der Lage sind, den Testgegenstand ab einem bestimmten Gehalt in Böden sensorisch zu erfassen. Die Validitätskriterien in diesem Versuch wurden erfüllt, wenn die Anzahl an toten bzw. fehlenden Tieren ≤ 10% war.

Der Versuch wurde in Gefäßen aus Polypropylen (Bellaplast GmbH, Alf, Deutschland) durchgeführt. Es wurde eine Trennscheibe senkrecht in die Mitte der Testgefäße gesetzt, so dass das Gefäß in zwei gleich große Kammern A und B unterteilt wurde. Jeweils 400 g TM an nicht kontaminiertem Boden wurde in Kammer A gegeben und 400 g TM des Versuchsbodens in Kammer B. Nach Zugabe des Bodens wurde die Trennscheibe aus dem Testgefäß entfernt. Zehn Tiere mit einem Frischgewicht von 300 bis 600 mg wurden in die Mitte des Gefäßes auf die Trennlinie zwischen den beiden zu untersuchenden Böden gesetzt. Die Gefäße wurden mit Deckeln aus Polypropylen mit Belüftungslöchern geschlossen, um eine Flucht der Tiere aus dem Gefäß zu verhindern. Die Testgefäße wurden bei einer Temperatur von  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  und einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 Stunden ( $\sim 700$  Lux) unter standardisierten Bedingungen für genau 48 Stunden inkubiert.

Nach 48 Stunden wurde die Trennscheibe an der Trennlinie in die Testgefäße gesetzt. Die Tiere in beiden Kammern wurden ausgezählt. Tiere die auf der Trennlinie lagen und geteilt wurden, wurden unabhängig von ihrer Länge jeweils als halbe Tiere beiden Kammern zugeordnet.

#### **4.4.6 Pflanzentest (OECD Richtlinie 208)**

Die Versuche wurden gemäß der OECD Richtlinie 208 (2006) durchgeführt. Die Pflanzensamen werden unter kontrollierten Bedingungen in den Boden eingesetzt und die Keimrate, die Mortalität der gekeimten Pflanzen sowie das Wachstum wurden bestimmt. Die Validitätskriterien sind erfüllt, wenn in den Kontrollen mindestens 70% der Samen aufgelaufen, mindestens 90% der aufgelaufenen Pflanzen überlebt haben und keine phytotoxischen Effekte aufgetreten sind. Der Pflanzentest wurde in einer Klimakammer (Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen, Deutschland) unter definierten Bedingungen durchgeführt. Die Versuche wurden über 14 Tage bei einer Temperatur von  $22^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ , einem Luftfeuchtegehalt von  $70\% \pm 25\%$ , einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 Stunden mit einer Naturlichtintensität von etwa 15000 Lux und Wellenlängen im Bereich von 400 – 700 nm durchgeführt.

In Becher aus Polypropylen wurde jeweils in die Mitte ein Loch gestanzt. Glasfaserdochte mit einer Länge von 20 cm werden zur Bewässerung genutzt. Der Versuchsboden hatte eine WHKmax von 40 – 60%. Die Dochte wurden durch das

Loch im Boden des Bechers gezogen und 280 g TM des Versuchsbodens ( $\leq 2$  mm) wurden in die Becher eingewogen. Mit einem Stempel wurden fünf Löcher mit einer Tiefe von ca. 50 mm in den Boden gestanzt. In die Löcher wurden die Saatkörner der Pflanze eingesetzt und mit Boden wieder abgedeckt.

Die Versuchsgefäße wurden für 24 Stunden zur Akklimatisierung in die Klimakammer gestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Dochte der einzelnen Replikate jeweils in ein Wasserreservoir gehängt. Das Wasserreservoir wurde mit destilliertem Wasser und dem Flüssigdünger „Compo Grünpflanzendünger“ (Compo GmbH, Münster, Deutschland) gefüllt. 1 mL des Flüssigdüngers wurde auf einen Liter destilliertes Wasser gegeben. Die Oberfläche der Versuchsgefäße und der Glasfaserdocht wurden mit destilliertem Wasser leicht angefeuchtet. In regelmäßigen Abständen wurde das Wasserreservoir kontrolliert und nach Bedarf neu gefüllt. Die Versuchsgefäße wurden darauf kontrolliert, dass ihre Oberfläche nicht austrocknet und bei Bedarf wieder angefeuchtet.

Der Versuch beginnt, wenn in den Kontrollen insgesamt mindestens 50% der eingesetzten Samen gekeimt sind. Innerhalb des Versuchszeitraums wurden die gekeimten Pflanzen regelmäßig auf Anomalitäten bezüglich des Aussehens und des Wachstums untersucht. Hierbei wird besonders auf Nekrosen (Absterben von Pflanzen bzw. Pflanzenteilen), Wuchsanomalien (Verformung von Spross und Blättern) und Chlorosen (Verfärbung von Spross und Blättern) geachtet. Nach 14 Tagen wurde in allen Gefäßen die Anzahl der Pflanzen und deren Biomasse bestimmt. In allen Versuchen wurde zusätzlich noch die Biomasse der Wurzeln bestimmt. In einigen der Versuche wurden Blätter, Spross und Wurzeln voneinander getrennt, um den Gesamt Ag-Gehalt in den einzelnen Pflanzenteilen zu bestimmen.

#### **4.4.7 Atmungshemmtest (OECD Richtlinie 209)**

Der Atmungshemmtest wurde nach OECD Richtlinie 209 (1984) durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, ob die aeroben Mikroorganismen im Klärschlamm durch den Testgegenstand in ihrer Atmungsaktivität beeinflusst werden. Der Atmungshemmtest wurde vor allem als ein Screening Verfahren genutzt, um vorab Informationen für spätere Kläranlagensimulationen zu gewinnen. Die Validität des Versuches wurde mit 3,5-Dichlorphenol als Referenzsubstanz untersucht. 3,5-Dichlorphenol ist laut Richtlinie als Referenzsubstanz im Atmungshemmtest

geeignet. Die  $EC_{50}$  von 3,5-Dichlorphenol muss zwischen 5 und 30 mg/L liegen, damit die Validität des Versuches sichergestellt ist. Zusätzlich dürfte die Varianz der Kontrollen: I. eine Abweichung vom Mittelwert  $\leq 7,5\%$ ; II. eine Abweichung  $K_{min}$  von  $K_{max} \leq 15\%$  aufweisen. Für den Versuch wurde Klärschlamm aus der Kläranlage Schmallingen entnommen. Der pH-Wert des Klärschlammes sollte bei  $7,5 \pm 0,5$  liegen und wird in der Kläranlage Schmallingen bei einem Wert von 7,0 gehalten.

Der Klärschlamm wurde zunächst über ein Sieb ( $\leq 2$  mm) gegeben und zwischen Probenahme und Gebrauch unter einem Abzug gerührt (mit einem Magnetrührer bei 500 rpm) und belüftet. Mit  $\frac{1}{4}$  starker Ringerlösung wurde der Klärschlamm einmal gewaschen. Dabei werden Rührapparatur und Belüftung ausgeschaltet, damit sich der Klärschlamm absetzen kann. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entnommen und durch die Ringerlösung ersetzt. Nach dem Waschen des Klärschlammes wurde der Trockensubstanzgehalt (TS-Gehalt) festgestellt. Der TS-Gehalt wurde mit  $\frac{1}{4}$  starker Ringerlösung auf 4 g/L eingestellt. Mit diesem TS-Gehalt ergibt sich später nach Verdünnung im Testgefäß ein TS-Gehalt von 1,6 g/L, wie in der Richtlinie vorgeschrieben.

Synthetisches Abwasser wurde gemäß der Richtlinie angesetzt und sowohl das destillierte Wasser als auch das synthetische Abwasser wurden nach dem Schema der Richtlinie in einen 1 L Erlenmeyerkolben vorgelegt. Der Inhalt wurde kontinuierlich mit 300 rpm gerührt und mit einem Sauerstoffdurchfluss von 0,5 – 1 L/min durch einen Belüftungsstab belüftet. Das Endvolumen in den Erlenmeyerkolben lag bei 500 mL bestehend aus destilliertem Wasser und Testgegenstand sowie 16 mL synthetischem Abwasser und 200 mL Klärschlamm. In die Kontrollen zu Beginn und Ende des Versuchs wurde statt Testgegenstand ein größeres Volumen an destilliertem Wasser gegeben. Jeweils 10 Minuten vor Zugabe des Klärschlammes wurde die Testsubstanz hinzugegeben. Dies sicherte die Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch definierte Kontaktzeiten der Probe mit dem Umgebungsmedium. 200 mL des eingestellten Klärschlammes wurden in Intervallen von jeweils 15 Minuten in die Erlenmeyerkolben gegeben. Die Versuche wurden, wenn nicht anders vorgesehen, in folgender Reihenfolge durchgeführt:

Kontrolle 1; Testgegenstand (3-7 verschiedene Konzentrationen); Kontrolle 2; Referenzsubstanz (3 Konzentrationen); Kontrolle 3.

Nach Ablauf einer Inkubationszeit von drei Stunden wurden in 15 Minuten Intervallen Messungen des Sauerstoffgehaltes durchgeführt. Hierzu wurde aus dem Erlenmeyerkolben eine Probe entnommen und in einen 100 mL Erlenmeyerkolben überführt. Mit einer Sauerstoffelektrode wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten im Abstand von 20 Sekunden der Sauerstoffgehalt der Probe gemessen.

#### **4.4.8 Kläranlagensimulation (OECD Richtlinie 303A)**

Die Kläranlagensimulationen wurden gemäß OECD Richtlinie 303A (2001) durchgeführt. Untersucht wurde, in welchem Maß die Abbauleistung der Mikroorganismen im Klärschlamm durch NM-300K bzw. AgNO<sub>3</sub> beeinflusst wird. Hierzu wurde eine definierte Konzentration (100 mg/L) an „dissolved organic carbon“ (DOC) kontinuierlich in die Anlage geleitet. Die Menge an DOC im Ein- und Auslauf der Kläranlage wurde gemessen und über die Elimination des DOC wurden Aussagen über den Einfluss der Testsubstanz auf die Abbauleistung der Mikroorganismen getroffen. Es wurden in den Versuchen bis zu sechs Laborkläranlagen (behrotest® Laborkläranlage KLD 4N, Germany) mit einer Denitrifikationsstufe, einer Nitrifikationsstufe (Belüftungsbecken) und einem Absetzbecken genutzt. Das Gesamtvolumen einer Laborkläranlage lag bei 10 Litern, wobei die Denitrifikationsstufe ein Volumen von 3,5 Litern, die Nitrifikationsstufe ein Volumen von 4,5 Litern und das Absetzbecken ein Volumen von 2,0 Litern hatten. Der Versuch erfüllt die Validitätskriterien, wenn die DOC Elimination nach zwei Wochen  $\geq 80\%$  ist.

Gemäß der Richtlinie 303a wurde die Raumtemperatur kontinuierlich zwischen 20 und 25°C gehalten. Es wurde über den gesamten Versuchszeitraum der Sauerstoffgehalt im Nitrifikationsbecken kontrolliert und auf Werte zwischen 2,0 und 3,5 mg O<sub>2</sub>/L reguliert. Als Nährmedium für die Mikroorganismen und Einlauf in die Laborkläranlagen wurde synthetisches Abwasser gemäß Richtlinie genutzt. Dieses setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 160 mg Pepton,
- 110 mg Fleischextrakt,
- 30 mg Urea,
- 28 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,
- 7 mg NaCl,

- 4 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  und
- 2 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  pro Liter destilliertem Wasser.

Das synthetische Abwasser wurde 10fach konzentriert angesetzt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Auch die Stammsuspension/-lösung des jeweiligen Testgegenstandes wurde 10fach konzentriert angesetzt und im Kühlschrank gelagert.

Die Zugabe der Testsubstanz und des synthetischen Abwasser erfolgte über ein installiertes Schlauchsystem. Zunächst wurde Trinkwasser aus 200 L Vorratsbehältern in das Schlauchsystem geleitet. Über ein Y-Verbindungsstück wurde im Anschluss kontinuierlich das 10fach konzentrierte synthetische Abwasser mit eingeleitet, wodurch eine Verdünnung von 1:10 erzeugt wurde. Bei allen Anlagen in die Testgegenstand eingeleitet wurden, wurde die Stammsuspension zuletzt ebenfalls über ein Y-Verbindungsstück in das Schlauchsystem eingeleitet. Auch hier verdünnt sich die 10fach stärker konzentrierte Stammsuspension 1:10. Über diese Applikationsmethode wurde ein DOC im Einlauf der Laborkläranlagen von ~100 mg/L erreicht. Je nach Versuchsdurchführung wurde der Einlauf entweder in das Denitrifikationsbecken oder in das Nitrifikationsbecken dosiert. Die hydraulische Retentionszeit betrug sechs Stunden, woraus sich bezogen auf das Volumen des Nitrifikationsbeckens (4,5 L) eine Durchflussrate von 750 mL/h bzw. von 18 L/d ergab. Die Durchflussrate im Schlauchsystem wurde dreimal pro Woche überprüft und wenn nötig wurde die Geschwindigkeit der Pumpen reguliert.

Zu Testbeginn wurde Klärschlamm aus der Kläranlage Schmollenberg entnommen und der TS-Gehalt des Klärschlammes bestimmt. Im Anschluss wurde Klärschlamm in das Nitrifikations- und Denitrifikationsbecken zu gleichen Teilen gegeben und mit Trinkwasser aufgefüllt, so dass ein TS-Gehalt von 2,5 g TS/L erzielt wurde. Es wurde solange nur synthetisches Abwasser mit einer Durchflussrate von 750 mL/h in die Kläranlagen dosiert, bis der Abbau des DOC-Gehaltes bei  $\geq 90\%$  lag. Nachdem dieser Wert in allen Anlagen erreicht wurde, wurde mit der Zugabe der Stammsuspension von NM-300K bzw.  $\text{AgNO}_3$  (je nach Test) begonnen. Die Zugabe der Ag-Stammsuspension erfolgte über eine Dauer von mindestens 10, maximal 18 Tagen je nach Versuchsdurchführung. Täglich wurde der DOC-Gehalt in Ein- und Auslauf der Kläranlagen bestimmt. Periodisch wurde der pH Wert sowohl in

Denitrifikationsstufe und Nitrifikationsstufe als auch in Ein- und Auslauf der Kläranlagen gemessen. Bei pH-Werten im Klärschlamm unterhalb von pH 7 wurde versucht der pH Reduzierung entgegenzuwirken. Hierzu wurde bei den Kläranlagensimulationen ohne Denitrifikation die Zugabe von  $K_2HPO_4$  leicht erhöht, während bei den Versuchen mit Denitrifikation kontinuierlich Klärschlamm (2 L/h) aus dem Nitrifikationsbecken in das Denitrifikationsbecken gepumpt wurde. Der TS-Gehalt wurde ebenso wie der pH-Wert periodisch überprüft und bei Überschreitung der Grenzwerte (Range: 1-3 g TS/L) wurde Klärschlamm entnommen. Einmal pro Woche wurde zusätzlich der Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumgehalt im Auslauf überprüft.

Proben für die chemische Analytik des Gesamtgehaltes an Ag wurden über die Dauer der Zugabe von Ag-Stammlösung täglich mit einem Volumen von 20 mL aus Ein- und Auslauf der Kläranlagen entnommen. Die Proben wurden zur späteren Untersuchung bei einer Temperatur von  $-21^{\circ}C$  eingefroren und gelagert.

#### **4.4.9 Manometrischer Respirationstest (OECD Richtlinie 301 F)**

Der Manometrische Respirationstest wurde nach OECD Richtlinie 301F (1992) Abschnitt F durchgeführt. Der Sauerstoffverbrauch der Mikroorganismen in Klärschlamm wird, in Gegenwart eines Testgegenstandes, durch die Messung an einem Saproimat (Respiromat, IBUK Abwassertechnik UITZ GmbH & Co KG, Königsbrunn) über 28 Tage betrachtet. Die Menge des vom Prüfgegenstandes aufgenommenen Sauerstoffes wird als prozentualer Anteil des theoretischen Sauerstoffbedarfs angegeben. Der Versuch erfüllt die Validitätskriterien, wenn:

- die Sauerstoffaufnahme der Inokulumkontrolle (nur Klärschlamm)  $\leq 60$  mg/L,
- die Abbauraten in den Parallelansätzen mit Prüfgegenstand in der Plateauphase, am Testende oder am Ende des 10 Tage Fensters sich um weniger als 20% unterscheiden,
- der Referenzgegenstand (Natriumbenzoat) mehr als 60% des ThSB innerhalb der ersten 14 Tage erreicht hat,
- der Abbau in der Toxizitätskontrolle über 25% liegt.

Über die Strukturformel des Testgegenstandes wird zunächst der theoretische Sauerstoffbedarf berechnet. Bei der Versuchsdurchführung wird ein definiertes Volumen eines angeimpften Mineralmediums mit einer bekannten Konzentration an

Testgegenstand (100 mg/L), die einem theoretischen Sauerstoffbedarf von mindestens 50 – 100 mg/L als einziger organischer Kohlenstoffquelle entspricht, in einer geschlossenen Flasche bei  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  unter Rühren 28 Tage inkubiert.

Das verwendete Mineralmedium setzt sich aus vier Stammlösungen zusammen. Lösung A besteht aus  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und wird auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Lösung B besteht aus  $\text{CaCl}_2$ , Lösung C aus  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  und Lösung D aus  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ . Zum Ansatz des Mineralmediums werden 10 mL von Lösung A mit 800 mL destilliertem Wasser gemischt, jeweils 1 mL von Lösung C, B und D werden hinzu pipettiert und im Anschluss wird das Volumen auf 1000 mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Als Inokulum dient Klärschlamm aus einer Kläranlage mit vorwiegend häuslichem Abwasser. Vor Versuchsbeginn wird der TS-Gehalt des Klärschlammes bestimmt und mit isotonischer Lösung auf einen TS-Gehalt von 3 -5 g/L eingestellt.

## 4.5 Langzeitversuche

### 4.5.1 Langzeitversuch 1

In dem ersten Langzeitversuch, wurde Klärschlamm aus der kommunalen Kläranlage in Schmallingenberg entnommen. Nachdem dem Klärschlamm NM-300K bzw.  $\text{AgNO}_3$  zugesetzt wurden, wurde er mit Flockungsmittel entwässert und in 8 kg RefeSol 01A eingearbeitet.

Die Zielgehalte an NM-300K bzw.  $\text{AgNO}_3$  im Boden wurden auf Basis der Erkenntnisse aus den Untersuchungen ohne Zugabe von Klärschlamm in diesem Versuch mit 2,5 und 6,0 mg/kg TM Boden gewählt. Dementsprechend wurden in 1,67 g TS Klärschlamm Gehalte an NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  gegeben, die zu einem Bodengehalt von 2,5 und 6,0 mg/kg TM Boden führen. Dies entspricht Ag-Gehalten im Klärschlamm von ca. 1500 und 3600 mg/kg TS Klärschlamm, also ungefähr dem 10 und 24fachen dessen, was in der Literatur maximal an Silber im Klärschlamm angegeben wird.

Am Morgen des Ansatztages wurde Klärschlamm aus der Kläranlage Schmallingenberg entnommen. Neben dem Klärschlamm wurde zusätzlich eine Probe des vorverdünnten 2%igen Flockungsmittels zum Eindicken bzw. Entwässern des Klärschlammes von der Kläranlage bezogen. Der TS-Gehalt des Klärschlammes

wurde aus fünf Messungen an einem Halogenofen bestimmt. Während der TS-Gehalt bestimmt wurde, wurde der Klärschlamm kontinuierlich mit 500 rpm gerührt und mit synthetischer Luft belüftet.

Im nächsten Schritt wurde der TS-Gehalt des Klärschlammes auf 8 g/L eingestellt. Der Klärschlamm wurde zu jeweils 1,75 L auf fünf Bechergläser aufgeteilt, weiter belüftet (ca. 500 mL O<sub>2</sub>/h) und mit 300 rpm gerührt. Die benötigten Konzentrationen an NM-300K oder AgNO<sub>3</sub> wurden nicht auf einmal sondern in regelmäßigen Intervallen hinzugegeben, um eine Hemmung der Mikroorganismen zu verhindern. Es wurde für NM-300K eine Stammsuspension und für AgNO<sub>3</sub> eine Stammlösung wie in 4.3.1 beschrieben hergestellt. NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurden in den niedrigeren Konzentrationen in zwei Schritten (NM-300K: 0,5 mL; AgNO<sub>3</sub>: 10 mL) alle 30 Minuten und in den höheren Konzentration in drei Schritten (NM-300K: 0,8 mL; AgNO<sub>3</sub>: 16 mL) alle 20 Minuten hinzugegeben.

Nach einer Stunde Kontaktzeit von Testgegenstand und Klärschlamm wurden 33 mL des 2%igen Flockungsmittels zur Entwässerung des Klärschlammes in das Gefäß pipettiert und für fünf Minuten weiter gerührt. Die Zugabe bzw. Menge des genutzten Flockungsmittels war dabei abhängig von dem TS-Gehalt und wurde strikt auf Basis der Angaben der Kläranlage Schmollenberg durchgeführt. Nach Zugabe des Flockungsmittels konnte sich der ausgeflockte Klärschlamm über einen Zeitraum von 15 Minuten absetzen. Dann wurde der Überstand an Flüssigkeit mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Der eingedickte Klärschlamm wurde vollständig auf Zentrifugengefäße aufgeteilt und für 20 Minuten bei 10.500 rpm zentrifugiert, um den Klärschlamm weiter zu entwässern. Der Überstand an Flüssigkeit wurde nach der Zentrifugation entfernt.

Von dem bei der Zentrifugation entstandenen Klärschlamm pellet wurde der TS-Gehalt im Halogenofen bestimmt. Es wurde berechnet, welche Menge des Klärschlammes den 1,67 g TS Klärschlamm entsprechen, die laut deutscher Klärschlammverordnung pro kg TM Boden auf Ackerflächen aufgetragen werden dürfen. Die entsprechende Menge an eingedicktem Klärschlamm wurde in destilliertem Wasser aufgeschlämmt und auf den Versuchsboden RefeSol 01A aufgetragen. Der Klärschlamm wurde wieder aufgeschlämmt, um ihn besser in den Boden einarbeiten zu können und um somit eine homogenere Verteilung des Klärschlammes im Boden gewährleisten zu können. In einem Becherglas wurde der

Klärschlamm in 75% des, zum Einstellen der  $WHK_{max}$ , verfügbaren destillierten Wassers aufgeschlämmt und auf den RefeSol 01A aufgetragen. Der Boden wurde gut durchmischt. Das restliche zur Verfügung stehende Wasser (25%) wurde zum Ausspülen des Becherglases genutzt und ebenfalls auf den Boden aufgetragen. Der Boden wurde nochmals durchmischt und  $WHK_{max}$  und pH-Wert des Bodens wurden überprüft.

Es wurden jeweils zwei Replikate je Kontrolle (mit und ohne Klärschlamm) und Konzentration (NM-300K und  $AgNO_3$ ) angesetzt. Jedes der Replikate wurde separat angesetzt. Der Boden wurde in 5 L PE-Testgefäße gefüllt, mit einem Deckel mit Belüftungslöchern abgedeckt und in einem Inkubationsschrank bei 20°C gelagert.

Nach 11 / 32 / 60 / 100 und 180 Tagen wurden die Ansätze mit folgenden Testsystemen untersucht:

- Potentielle Ammoniumoxidation nach ISO Richtlinie 15685 (2004)
- C-Transformation nach OECD Richtlinie 217 (2000)
- Mikrobielle Bodendiversität nach Richtlinie ISO/TS 22939 (2010)
- Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208 (2006)

#### **4.5.2 Langzeitversuch 2**

Ziel dieses Versuchs war es, möglichst realistisch den Weg von NM-300K über die Kanalisation in eine kommunale Kläranlage und zuletzt über den Klärschlamm auf landwirtschaftliche Flächen zu simulieren.

Es wurde eine Kläranlagensimulation nach OECD Richtlinie 303a mit einer kontinuierlichen Zugabe von NM-300K und  $AgNO_3$  als Referenz über 10 Tage angesetzt. Der Pfad in der Kanalisation wurde simuliert, indem NM-300K schon im Schlauchsystem bei der Dosierung in die Kläranlage mit synthetischem Abwasser vermischt wurde. Die Kläranlagensimulation wurde mit einer Nitrifikations- und einer vorgeschalteten Denitrifikationsstufe durchgeführt. Nachdem der Klärschlamm über 10 Tage kontinuierlich mit verschiedenen Konzentrationen von NM-300K und  $AgNO_3$  versetzt wurde, wurde er wie in Langzeitversuch 1 (siehe 4.5.1) verarbeitet und zuletzt in RefeSol 01A eingearbeitet. Der Langzeitversuch wurde über 140 Tage durchgeführt, nachdem sich in dem ersten Langzeitversuch gezeigt hatte, dass die Mikroorganismenaktivität im Boden bei einer Inkubation im Schrank über 180 Tage zu stark abgenommen hatte.

Die Applikation von NM-300K bzw.  $\text{AgNO}_3$  auf den Klärschlamm via Kläranlagensimulation wurde mit fünf Laborkläranlagen mit jeweils einer Denitrifikations- und einer Nitrifikationsstufe sowie dem Absetzbecken durchgeführt. Nach einer kurzen Einlaufphase von drei Tagen wurden über 10 Tage Konzentrationen von 0,4 / 4 und 9 mg/L für NM-300K und 0,4 mg/L für  $\text{AgNO}_3$  in die Denitrifikationsstufe eingeleitet. Die Applikation des Testgegenstandes in die Kläranlage erfolgt wie in Abschnitt 4.4.8 beschrieben. Der Testgegenstand wurde über das Schlauchsystem in die Denitrifikationsstufe eingeleitet. Regelmäßig wurde der TS-Gehalt in den beiden Stufen überprüft. Abweichend von der Richtlinie wurde in diesem Versuch kein Klärschlamm bei einem TS-Gehalt über 3 g/L entnommen, da eine große Menge an Klärschlamm für den Lagerversuch benötigt wurde. Entsprechend wurden TS-Gehalte zwischen 5,0 und 5,5 g/L zum Versuchsende gemessen.

Am Morgen vor dem Versuchsende der Kläranlagensimulation wurde in der Kläranlage Schmallebenberg erneut das vorverdünnte 2%ige Flockungsmittel bezogen. Die Inhalte der einzelnen Anlagen wurden jeweils in einen Eimer abgelassen und das Flockungsmittel wurde unter Rühren zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von fünf Minuten wurde das Rühren beendet, der Klärschlamm setzte sich ab und der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe entnommen. Der Rest des Klärschlammes wurde bei 10.500 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Das Klärschlamm pellet wurde entnommen und eine TS-Bestimmung wurde am Halogenofen durchgeführt. Über Nacht wurde eine weitere TS-Bestimmung im Trockenschrank bei 105°C gemacht. Der Klärschlamm der einzelnen Anlagen wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde der Schlamm zunächst akklimatisiert und im Anschluss erfolgte die Applikation des Klärschlammes auf den Boden (4.5.1).

Die verschiedenen Konzentrationen an NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  wurden mit einer Durchflussrate von 750 mL über 10 Tage kontinuierlich in die Kläranlage eingeleitet. Der TS-Gehalt an Klärschlamm in der Anlage wurde zwischen 3 und 5 g/L gehalten. Bei einem Volumen von 10 L und der Annahme, dass ca. 99% des Testgegenstandes im Klärschlamm verbleibt wurde berechnet, dass Konzentrationen von ca. 1440 / 14400 / 32400 mg Ag/kg TS Klärschlamm zum Ende der Kläranlagensimulation im Klärschlamm vorliegen. Bei einem Eintrag von 1,67 g TS

Klärschlamm / kg TM Boden lagen die Zielgehalte an NM-300K bzw. AgNO<sub>3</sub> bei ca. 2,4 / 24,1 und 54,1 mg/kg TM Boden für NM-300K und bei 2,4 mg/kg TM Boden für AgNO<sub>3</sub>. Es wurden bewusst diese hohen Konzentrationen in die Kläranlage eingeleitet, da auf diese Weise die Ergebnisse der Kläranlagensimulation mit NM-300K (0) validiert wurden. Zusätzlich ergab sich ein Bodengehalt der im Bereich des ersten Langzeitversuches (2,4 mg/kg TM Boden) und es ergaben sich wesentlich höhere Bodengehalte (24,1 / 54,1 mg/kg TM Boden) mit denen Aspekte wie die maximale Aufnahmefähigkeit betrachtet wurden, die aber auch Aufschluss darüber gaben, ab wann es bei sehr hohen Gehalten an NM-300K im Klärschlamm zu Wirkungen auf die Bodenmikroorganismen kommt.

Es wurden jeweils zwei Replikate je Kontrolle und Bodengehalt an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> angesetzt. Jedes Replikat wurde separat angesetzt. Der Boden wurde in 5 L PE-Testgefäße gefüllt, mit einem Deckel mit Löchern abgedeckt und in einem Inkubationsschrank bei 20°C gelagert. Nach 11 / 32 / 60 / 100 und 140 Tagen wurden die Ansätze mit folgenden Testsystemen untersucht:

- Potentielle Ammoniumoxidation nach ISO Richtlinie 15685 (2004)
- C-Transformation nach OECD Richtlinie 217 (2000)
- Basalatmung nach OECD Richtlinie 217 (2000)
- Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208 (2006)

Ursprünglich war die Messung der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen nicht vorgesehen, wurde aber ab Langzeitversuch 2 Tag 32 mit durchgeführt, um detaillierter Einsicht in die Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die Bodenmikroflora zu erlangen.

### **4.5.3 Langzeitversuch 3**

Untersucht wurde hier, ob eine Faulung des Klärschlammes eine Veränderung der Toxizität von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorruft. Zu diesem Zweck wurde eine Teilmenge des Klärschlammes aus der Kläranlagensimulation zu Langzeitversuch 2 entnommen. Es wurde Klärschlamm aus der Kontrollanlage und den Anlagen mit einem Einlauf von 0,4 mg/L an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> untersucht. Der TS-Gehalt des Klärschlammes wurde bestimmt und die Teilmenge des Klärschlammes wurde in einem anaeroben Schrank (Vakuum Brutschrank; Heraeus VT 5050 EK) platziert. Unter kontinuierlichem Rühren wurde der Klärschlamm für 30 Tage bei 40°C unter

anaeroben Bedingungen gefault. Nach Beendigung der Faulung wurde erneut der TS-Gehalt bestimmt. Die TS-Bestimmung ergab, dass für diesen Versuch genug Klärschlamm für einen Ansatz von je 2 kg TM Boden zur Verfügung stand. Der Klärschlamm wurde wie in Abschnitt 4.5.1 in den Boden eingearbeitet. Auf eine Messung des Ag-Gehaltes wurde in diesem Versuch verzichtet, da diese in Langzeitversuch 2 durchgeführt wurde. Der Ag-Gehalt im Boden wurde somit auch für diesen Versuch auf 2,8 mg/kg TM Boden für NM-300K und 2,5 mg/kg TM Boden für AgNO<sub>3</sub> festgelegt.

Es wurden jeweils zwei Replikate je Kontrolle und Konzentration mit je 2 kg TM Boden angesetzt. Jedes Replikat wurde dabei separat angesetzt. Der Boden wurde in 5 L PE-Testgefäße gefüllt, mit einem durchlöchernten Deckel abgedeckt und in einem Inkubationsschrank bei 20°C gelagert. Nach 11 / 32 / 60 / 100 und 140 Tagen wurden die Ansätze mit folgenden Testsystemen untersucht:

- Potentielle Ammoniumoxidation nach ISO Richtlinie 15685 (2004)
- C-Transformation nach OECD Richtlinie 217 (2000)
- Basalatmung nach OECD Richtlinie 217 (2000) – ab Tag 32

#### **4.5.4 Langzeitversuch 4**

Ziel dieses Versuchs war es möglichst realistisch den Weg von NM-300K über die Kanalisation in eine kommunale Kläranlage und zuletzt über den Klärschlamm auf landwirtschaftliche Flächen zu simulieren. Außerdem wurden in diesem Versuch realitätsnahe Ag-Gehalte im Klärschlamm und somit auch Bodengehalte untersucht.

Es wurde eine Kläranlagensimulation nach OECD Richtlinie 303a mit einer kontinuierlichen Zugabe von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> als Referenz über 10 Tage angesetzt. Die Kläranlagensimulation wurde mit sechs Laborkläranlagen mit jeweils einer Denitrifikations- und einer Nitrifikationsstufe sowie dem Absetzbecken durchgeführt. Der Pfad in der Kanalisation wurde simuliert, indem NM-300K schon im Schlauchsystem bei der Dosierung in die Kläranlage mit synthetischem Abwasser vermischt wurde. Hierdurch konnten parallel weitere Informationen über das Verhalten und den Verbleib von NM-300K in der Kläranlage auch unter Berücksichtigung der Denitrifikation gewonnen werden. Der Klärschlamm wurde über 10 Tage kontinuierlich mit verschiedenen Konzentrationen von NM-300K

kontaminiert, wie in Abschnitt 4.5.2 verarbeitet und zuletzt in RefeSol 01A eingearbeitet. Der Langzeitversuch wurden über 140 Tage durchgeführt.

Es wurden Konzentrationen von 0,04 / 0,4 / 0,8 und 1,6 mg/L für NM-300K und 0,4 mg/L für AgNO<sub>3</sub> in die Denitrifikationsstufe eingeleitet. Die Applikation des Testgegenstandes in die Kläranlage erfolgt wie in Abschnitt 4.4.8 beschrieben. Der Testgegenstand wurde über das Schlauchsystem in die Denitrifikationsstufe eingeleitet. Regelmäßig wurde der TS-Gehalt in den beiden Stufen überprüft. Abweichend von der Richtlinie wurde in diesem Versuch kein Klärschlamm bei einem TS-Gehalt über 3 g/L entnommen, da eine große Menge an Klärschlamm für den Lagerversuch benötigt wurde. Innerhalb der 10 Tage, in denen NM-300K und AgNO<sub>3</sub> in die Anlagen dosiert wurde, kam es allerdings nur zu geringfügigen Überschreitungen des Grenzwertes von 3 g/L. Die Aufarbeitung und Applikation des Klärschlammes wurde wie in 4.5.2 durchgeführt.

Die verschiedenen Konzentrationen an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurden mit einer Durchflussrate von 750 mL über 10 Tage kontinuierlich in die Kläranlage eingeleitet. Der TS-Gehalt an Klärschlamm in der Anlage wurde bei ca. 3,0 g/L gehalten. Bei einem Volumen von 10 L und der Annahme, dass ca. 99% des Testgegenstandes im Klärschlamm verbleibt, wurde berechnet, dass Konzentrationen von ca. 240 / 2400 / 4800 und 9600 mg Ag/kg TS Klärschlamm zum Ende der Kläranlagensimulation im Klärschlamm vorliegen. Bei einem Eintrag von 1,67 g TS Klärschlamm/kg TM Boden lagen die Zielgehalte an NM-300K bzw. AgNO<sub>3</sub> bei ca. 0,4 / 4,0 / 8,0 und 16,0 mg/kg TM Boden für NM-300K und bei 4,0 mg/kg TM Boden für AgNO<sub>3</sub>.

Es wurde nur ein Replikat je Kontrolle und Bodengehalt an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> angesetzt. Dafür wurde der Klärschlamm zunächst aufgeteilt und die Applikation wurde zweimal durchgeführt. In diesem Versuch erfolgte die Applikation auf je 6 kg TM Boden. Im Anschluss wurde der Boden vereinigt, gut durchmischt und als ein Replikat gelagert. Hierdurch wurde vermieden, dass durch die Probenahme für analytische Prozesse die Füllhöhe in einem der Replikate schneller sinkt, als dies in dem zweiten Replikat der Fall ist. Dies sollte eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse bewirken.

Der Boden wurde in 20 L PE-Testgefäße gefüllt, mit einem Deckel mit Löchern abgedeckt und in einem Inkubationsschrank bei 20°C gelagert. Nach 11 / 32 / 60 / 100 und 140 Tagen wurden die Ansätze mit folgenden Testsystemen untersucht:

- Potentielle Ammoniumoxidation nach ISO Richtlinie 15685 (2004)
- C-Transformation nach OECD Richtlinie 217 (2000)
- Basalatmung nach OECD Richtlinie 217 (2000)
- Mikrobielle Bodendiversität nach Richtlinie ISO/TS 22939 (2010)
- Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208 (2006)

#### **4.5.5 Langzeitversuch 5**

In Langzeitversuch 5 wurde der erste Langzeitversuch validiert. Der Versuch wurde wie unter 4.5.1 beschrieben angesetzt. Zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Testsystemen wurde in diesem Versuch auch die Basalatmung an allen Messzeitpunkten gemessen, auf die Durchführung der mikrobiellen Bodendiversität und auch eines Pflanzentests nach Versuchsende wurde verzichtet.

Anders als in 4.5.1 beschrieben wurde nur ein Replikat je Kontrolle und Bodengehalt an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> angesetzt. Dafür wurde der Klärschlamm zunächst aufgeteilt und die Applikation wurde zweimal durchgeführt. In diesem Versuch erfolgte die Applikation auf je 4 kg TM Boden. Im Anschluss wurde der Boden vereinigt und als ein Replikat gelagert. Hierdurch wurde vermieden, dass durch die Probenahme für analytische Prozesse die Füllhöhe in einem der Replikate schneller sinkt, als dies in dem zweiten Replikat der Fall ist. Dies sollte eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse bewirken.

Der Boden wurde in 20 L PE-Testgefäße gefüllt, mit einem Deckel mit Löchern abgedeckt und in einem Inkubationsschrank bei 20°C gelagert. Die Füllhöhe der Testgefäße lag bei maximal 15 cm, damit keine abiotischen Zonen entstehen konnten. Nach 11 / 32 / 60 / 100 und 140 Tagen wurden die Ansätze mit folgenden Testsystemen untersucht:

- Potentielle Ammoniumoxidation nach ISO Richtlinie 15685 (2004)
- C-Transformation nach OECD Richtlinie 217 (2000)
- Basalatmung nach OECD Richtlinie 217 (2000)

## 4.6 Chemische Analytik

Der Ag-Gehalt wurde nach der Applikation des Testgegenstandes exemplarisch gemessen. Die Bestimmung in ausgewählten Versuchen wurde als ausreichend betrachtet, da die Applikation des Testgegenstandes in Böden einheitlich durchgeführt wurde und wiederholt gezeigt werden konnte, dass die Nominalgehalte den gemessenen Werten entsprachen.

Um die Menge an zugesetztem Silber in Böden, Klärschlamm oder wässrigen Proben zu quantifizieren, wurde der Gehalt an Silber in den Kontrollproben und den Versuchsansätzen, denen Silber zugesetzt wurden war, bestimmt. Der Gehalt in den Kontrollproben wurde von den Ansätzen mit zugesetztem Silber subtrahiert.

Alle Messungen wurden am Fraunhofer IME von der Abteilung „Umweltprobenbank und Elementanalytik“ im Labor „Umweltverhalten von Metallverbindungen“ durchgeführt.

### 4.6.1 „Diffusive gradients in thin films“ Verfahren

Zur Untersuchung des Gehaltes an Ag-Ionen im Bodenporenwasser wurden „diffusive gradients in thin films“, kurz DGTs, genutzt. Diese wurden von der Firma DGT Research Ltd in Lancaster, Großbritannien, bezogen. Die DGTs enthalten eine dünne Schicht aus Chelexharz getränkt, in ein Hydrogel und überdeckt mit einer Diffusionsschicht eines weiteren Hydrogels und eines Filters. Entsprechend müssen die Ionen zunächst die Diffusionsschicht aus Hydrogel und Filter passieren, um die Schicht aus Chelexharz zu erreichen. Auf der Chelexoberfläche sammeln sich die Ionen und können im Anschluss analysiert und quantifiziert werden. Der daraus resultierende Konzentrationsgradient in der Diffusionsschicht erlaubt eine Quantifizierung der Metallkonzentration in Lösung ohne vorherige Kalibration (Davison und Zhang 2011).

Die Untersuchung des Gehaltes an freien Ag-Ionen wurde mit zwei DGTs pro Ag-Gehalt im Boden durchgeführt. DGTs wurden in einem Regenwurm Reproduktionstest nach OECD Richtlinie 222 mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  genutzt. Die DGTs wurden an den Versuchstagen 0 / 26 und 54 in den Versuch eingesetzt.

Vor dem Gebrauch der DGTs wurde die Trockenmasse des Bodens bestimmt. Für die Probenvorbereitung wurden die DGTs in 0,01 mol/L NaCl Lösung gegeben, mit Argon gereinigt und im Anschluss für 24 Stunden in einem geschlossenen Behälter

mit Argon-Atmosphäre gelagert. Am Morgen wurden die DGTs aus dem Behälter entnommen und gründlich mit UHQ Wasser abgespült und in den Boden gegeben. Es war zu beachten, dass die Diffusionsschicht dabei nach oben ausgerichtet war und, dass sie komplett mit Boden überdeckt wurde. Die DGTs wurden für 48 Stunden in den Versuchsgefäßen inkubiert. Nach Ablauf der 48 Stunden wurden sie aus dem Boden entnommen, mit UHQ Wasser gründlich gereinigt und dann in Beuteln aus Polyethylen bei 4°C für nicht länger als vier Tage gelagert. Im Anschluss wurde die Chelexschicht aus den DGTs entnommen und sofort für 24 Stunden in 1,5 mL einer ein molaren Salpetersäure überführt. Ein Volumen von 1 mol/L Salpetersäure wurde eingestellt und der Ag-Gehalt der Lösung mit einer Agilent 7500ce ICP-MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) gemessen. Das Gerät wurde kurz vor der Messung in Abhängigkeit von der Konzentration der Proben kalibriert.

Der Gehalt an Ag-Ionen in den DGTs wurde nach der Messung entsprechend den Empfehlungen des Herstellers berechnet und als Masse pro Liter Porenwasser angegeben. Danach wurde der prozentuale Anteil der Ag-Ionen im Vergleich zu den nominalen Gehalten berechnet, um festzustellen, ob mit steigenden Ag-Gehalten im Boden auch der Gehalt an frei verfügbaren Ag-Ionen im Bodenporenwasser steigt.

#### **4.6.2 Aufschluss und Messung von Ag-haltigen Bodenproben und Regenwürmern**

Der Ag-Gehalt des Versuchsbodens RefeSol 01A wurde repräsentativ für zwei Bodengehalte (15 und 120 mg/kg TM Boden) bestimmt. Hierzu wurden sechs Proben an unterschiedlichen Stellen aus den Versuchsgefäßen im Regenwurm Reproduktionsversuch unmittelbar nach der Applikation von NM-300K entnommen. Der Aufschluss der Proben erfolgte nach ISO Richtlinie 11466 (1995).

Vor dem Aufschlussverfahren wurde der Boden bei 105°C getrocknet bis das Gewicht für mindestens 12 Stunden konstant blieb. Der Boden wurde für 10 Minuten mit einer Kugelmühle gemahlen. Für den Aufschluss der Proben wurden jeweils 3 g des homogenisierten Bodens mit 28 g Königswasser gemischt und bei Raumtemperatur für 16 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden fünf Siedesteine und drei Tropfen 1-Oktanol in die Proben gegeben, um ein Überkochen und Schäumen zu verhindern. Die Proben wurden für zwei Stunden bei 140°C gekocht und nach dem Kochen bei Raumtemperatur gekühlt. Die gekochten Proben wurden

dann in 100 mL Erlenmeyerkolben überführt und auf ein Volumen von 100 mL aufgefüllt. In einem letzten Schritt wurden die Proben filtriert (0.45 µm Spritzenfilter, Supor membrane, Pall Corporation, New York).

Die Regenwürmer wurden nach Entnahme aus jeweils einem Regenwurm Reproduktionstest mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> für 24 Stunden auf einem angefeuchteten Filterpapier entkotet und bei -21°C gelagert. Vor der Messung des Ag-Gehaltes wurden die Würmer in Flüssigstickstoff gegeben und unter einer Sterilbank gemahlen und homogenisiert. Die Proben wurden in geeignete Gefäße überführt und in einem Christ Alpha 1 - 2 Gefriertrockner (Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Germany) gefriergetrocknet bis ein konstantes Gewicht erreicht wurde.

Der Aufschluss erfolgte gemäß der Richtlinie für chemische Analysen des Umweltbundesamtes (Rüdel et al. 2011). Vor dem Aufschluss der Proben wurden 200 mg der Probe in Quartzgefäße überführt und mit 5 mL konzentrierter Salpetersäure vermischt. Die Proben wurden für 25 Minuten in einer Mikrowelle auf 220°C erhitzt, bei 220°C konstant für 30 Minuten gehalten und im Anschluss bei Raumtemperatur für eine Stunde heruntergekühlt. Der Initialdruck betrug bei diesem Verfahren 40 bar. Nach dem Aufschluss wurden die Proben auf ein Volumen von 20 mL mit UHQ Wasser aufgefüllt.

Der Ag-Gehalt der nun wässrigen Proben von Boden und Würmern wurden dann an einer IRIS Intrepid II ICP-OES (Thermo Electron, Dreieich, Germany) bei Wellenlängen von 328,068 und 338,289 nm gemessen. Für jede Probe wurden mindestens drei Messungen durchgeführt und daraus wurde das arithmetische Mittel von dem Messgerät gebildet. Als Referenzmaterial bei allen Messungen wurde der NIST Standard 2977 Mussel Tissue (Informationswert angegeben mit: 4,58 mg Ag/kg; bezogen von LGC Standards, Wesel, Germany) mit aufgeschlossen und gemessen. Zusätzlich wurde das zertifizierte Referenzmaterial TMDA-70 (Environment Canada; zertifizierte Konzentration von 10,9 µg Ag/L) in allen Messungen mit untersucht. Darüber hinaus wurde die Analysenmethode mit dem multi-element Merck IV Standard (Merck, Darmstadt, Germany) in einer geeigneten Konzentrationsreihe verifiziert.

#### **4.6.3 Aufschluss und Messung von Ag-haltigen wässrigen Proben und von Klärschlamm**

Bei den hier gemessenen wässrigen Proben handelte es sich hauptsächlich um Proben aus dem Ein- und Auslauf der Kläranlagensimulationen. Aber auch Stammsuspensionen von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurden auf ihren Ag-Gehalt untersucht. Die Klärschlammproben wurden zur Bilanzierung von Ag in den Kläranlagensimulationen auf ihren Ag-Gehalt untersucht. Zusätzlich wurde der grundsätzliche Silbergehalt des Klärschlammes aus der Kläranlage Schmallingenberg auf diesem Weg bestimmt. Der Aufschluss der Proben erfolgte nach DIN Richtlinie 38414-7 (1983).

Vor Aufschluss der jeweiligen Proben, wurden die Proben für mindestens eine Minute auf einen Vortexer gestellt und gut geschüttelt. Im Anschluss wurden 5 mL der Probe entnommen und in die Aufschlussgefäße überführt und 2 mL einer konzentrierten Salpetersäure wurden hinzugegeben. Der anschließende Aufschluss der Proben wurde mit Ultra Clave II Mikrowelle (MLS GmbH, Leutkirch im Allgäu, Germany) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: Erhitzen der Probe über 25 Minuten auf 220°C

Schritt 2: Proben verbleiben bei 220°C für 30 min in der Mikrowelle.

Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde die entstandene Lösung langsam mit UHQ Wasser auf 20 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde an einer ICP-OES (Iris Intrepid II, Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) mit einer an die Salpetersäurematrix angepassten Kalibration gemessen.

Der Aufschluss von Klärschlammproben, die mit NM-300K beladen waren erfolgte nach DIN Richtlinie 38414-7 (1983) und es wurde für diesen Aufschluss Königswasser verwendet. Der Klärschlamm wurde bei 105°C getrocknet und im Anschluss mit einer Kugelmühle gemahlen. Auf 3 g der getrockneten und homogenisierten Probe wurden 28 mL Königswasser gegeben. Die Mischung wurde über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag für zwei Stunden bei 140°C gekocht. Es wurden fünf Siedesteine und drei Tropfen 1-Oktanol in alle Aufschlussgefäße mit Klärschlamm gegeben.

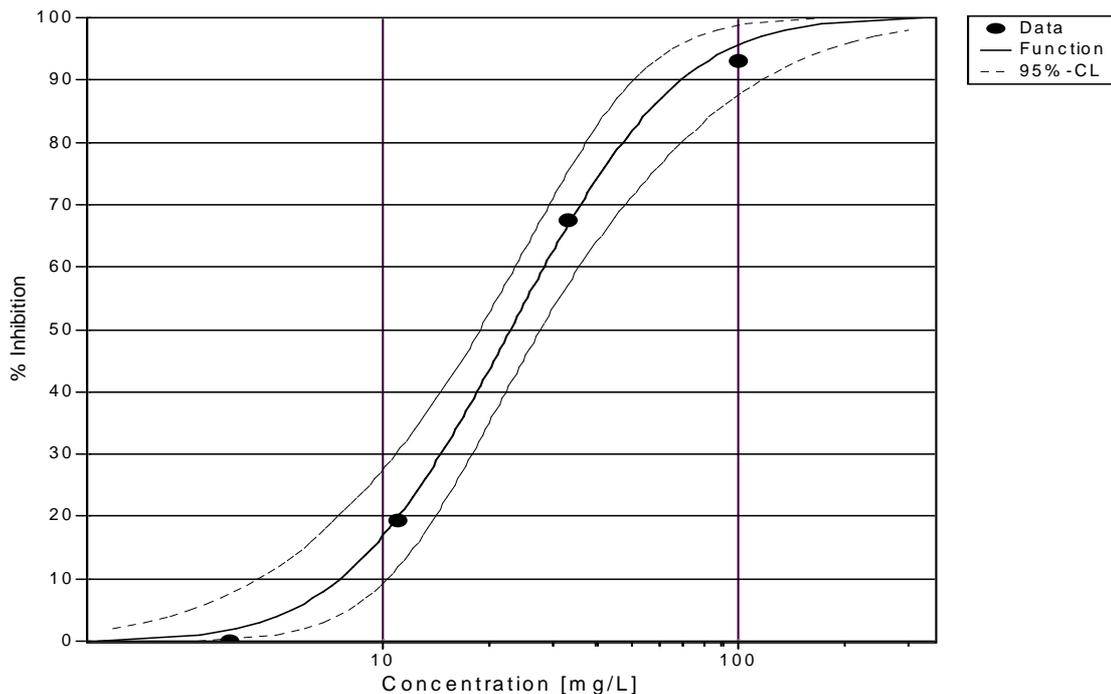
Die gekochten Proben wurden bei Raumtemperatur abgekühlt, gefiltert (Pall Acrodisc Syringe Filter, supor membrane, bezogen von VWR, Langenfeld, Germany) und

dann vorsichtig mit UHQ Wasser auf ein Volumen von 100 mL aufgefüllt. Nach einer für Königswasseraufschlüsse geeigneten Kalibration des Messgerätes wurden die Proben mit einer ICP-OES (Iris Intrepid II, Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) gemessen. Für die Messung muss eine Wellenlänge von 328,068 nm genutzt werden, da es nachgewiesen ist, dass z.B. bei einer Wellenlänge von 338,289 nm spektrale Interferenzen bei Klärschlamm auftreten können, die die Messergebnisse stark beeinflussen können.

#### **4.7 Statistische Auswertung und Konzentrations-Wirkungs-Kurven**

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms ToxRat Professional (Version 2.09 und 2.10, ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Deutschland), welches speziell zur statistischen Auswertung von ökotoxikologischen Testverfahren entwickelt wurde, durchgeführt. Das ToxRat Programm stand als Online Version zur Verfügung und wurde durchgängig durch Updates auf dem neusten Stand gehalten.

Die in dieser Arbeit vorliegenden NOEC, LOEC oder ECx-Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen über das Verfahren der Probitanalyse berechnet. Hierbei wurden jeweils die Messwerte der Kontrollen und der getesteten Konzentrationen in das Programm eingetragen. Das Programm ermittelte daraus die prozentuale Hemmung der verschiedenen Konzentrationen bezogen auf die Kontrolle. Anschließend wurde eine Kurve mit sigmoidalem Verlauf, die die einzelnen Testergebnisse möglichst gut verband, erstellt. Abbildung 4 zeigt beispielhaft einen solchen sigmoidalen Verlauf. Anhand der dahinterliegenden mathematischen Funktion wurden die ECx-Werte berechnet.



**Abbildung 4: Beispiel einer typischen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit Vertrauensintervallen, berechnet und dargestellt mit ToxRat professional 2.09**

Die Wiedergabe der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe einer semilogarithmischen Darstellung in einem Koordinatensystem. Der Hemmeffekt der getesteten Substanz wurde hierbei auf der Ordinate aufgetragen, auf der Abszisse wurde die Konzentration logarithmisch dargestellt. Aufgrund der logarithmischen Darstellung der Abszisse ist es nicht möglich, die Kontrolle als „Nullwert“ darzustellen. Aus diesem Grund beginnt der Kurvenverlauf nahe des Koordinatenursprungs, um ihn in den Diagrammen deutlich sichtbar zu machen. Soweit es möglich ist, gibt das Programm auch Vertrauensintervalle an. Dies ist allerdings stark abhängig von den Messwerten.

Das Programm mittelt, nach Eingabe der Messergebnisse, die Messwerte der Replikate und berechnet ihre Standardabweichung. Zusätzlich wurde vor jeder Berechnung von dem Programm geprüft, ob die erforderlichen Voraussetzungen für die statistische Analyse gegeben sind (z.B. Normalverteilung der Messwerte beim Williams Test). Die wichtigsten Einflussgrößen auf die Berechnung der Toxizitätswerte sind die Anzahl der Replikate der Kontrolle und der einzelnen Testkonzentrationen sowie die Anzahl und Spreizung der Konzentrationsstufen. Bei

der Probitanalyse werden das Testergebnis der Kontrolle sowie die Ergebnisse von drei Konzentrationsstufen, die eine Hemmung hervorrufen, benötigt. Bei einer ausreichenden Datengrundlage kann z.B. die Chemikalienkonzentration, die einen 50%igen Hemmeffekt hervorruft, aus der angenäherten mathematischen Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung als  $EC_{50}$ -Wert abgeleitet werden.

In den Langzeitversuchen 1 und 5 wurden jeweils nur die beiden höheren Bodengehalte an NM-300K und  $AgNO_3$  untersucht (NM-300K: Versuch 1 - 3,4 mg/kg TM Boden, Versuch 5 - 3,1 mg/kg TM Boden;  $AgNO_3$ : Versuch 1 - 4,0 mg/kg TM Boden, Versuch 5 - 4,1 mg/kg TM Boden). Eine Auswertung mit der zuvor beschriebenen Probitanalyse war nicht möglich. Die statistischen Berechnungen für die Langzeitversuche wurden auf Basis eines Vergleiches der einzelnen Bodengehalte mit den Kontrollen durchgeführt. Auch für diesen Vergleich wurde das Programm ToxRat genutzt. Zunächst wurde die Homogenität der Varianzen mit dem Levenes Test durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Berechnung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrolle und kontaminiertem Replikat mit dem Student-t-Test für homogene Varianzen oder dem Welch-t-Test für inhomogene Varianzen. Die Berechnungen erfolgten, abhängig von den zugrunde liegenden Messwerten, einseitig kleiner oder größer mit einem Vertrauensintervall von 95%.

## 5 Untersuchung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> nach Richtlinie – Wirkung im terrestrischen Ökosystem und auf Klärschlamm

Nach der Durchführung von Vorversuchen zur Applikation von NM-300K in terrestrische Testsysteme und zur Stabilität von NM-300K Stammsuspensionen für Versuche zur Wirkung in Kläranlagen wurde untersucht, bei welchen Bodengehalten und Konzentrationen NM-300K eine Wirkung auf die verschiedenen Testspezies hatte. Dies war Grundlage und Vorbereitung für die anschließenden Tests, die im Rahmen des realistischen Nutzungsszenarios durchgeführt wurden. Auf Grundlage der Erkenntnisse aus den Untersuchungen mit reinem NM-300K wurden die Konzentrationen für Kläranlagensimulationen und die daraus resultierenden Bodengehalte bestimmt. Ebenso wurde auf Grundlage dieser Untersuchungen eine Risikocharakterisierung für NM-300K vorgenommen.

Die Untersuchungen wurden gemäß den entsprechenden OECD Richtlinien durchgeführt. Den Schwerpunkt bildeten die Untersuchungen zur Toxizität von NM-300K im terrestrischen Ökosystem. Die Untersuchungen im Bereich der Kläranlage auf die Mikroorganismen im Klärschlamm komplettierten die Tests zur ganzheitlichen Bewertung des realistischen Nutzungsszenarios und zur Anfertigung einer Risikocharakterisierung. Eine Übersicht zu durchgeführten Versuchen ist in Tabelle 5 gegeben.

**Tabelle 5: Versuchsübersicht – Untersuchungen nach Richtlinie**

Testsystem	NM-300K	AgNO <sub>3</sub>
C-Transformation (OECD 217)	√	√
Potentielle Ammoniumoxidation (ISO 15685)	√	√
Regenwurm Reproduktionstest (OECD 222)	√	√
Regenwurm Fluchttest (DIN/ISO 17512 – 1)	√	√
Pflanzenwachstumstest (OECD 208)	√	√
Atmungshemmtest (OECD 209)	√	√
Kläranlagensimulation (OECD 303a)	√	√

## 5.1 Vorversuche

### 5.1.1 Applikation von NM-300K auf Boden

Im ersten Vorversuch wurde die Eignung der Applikation von NM-300K mit luftgetrockneten RefeSol 01A als Trägermaterial betrachtet. Diese Methodik war zuvor für nanopartikuläres TiO<sub>2</sub> genutzt worden. Da NM-300K im Gegensatz zu TiO<sub>2</sub> mit einem Dispersanten stabilisiert ist und nicht als Pulver vorliegt, musste die Applikationsmethodik für NM-300K validiert werden.

Aus dem ersten mit NM-300K durchgeführten Haupttest, einem Regenwurm Reproduktionstest, wurden kurz nach Applikation, bei Gehalten von 15 und 120 mg/kg TM, an sechs Stellen Proben von je 10 g TM Boden entnommen. Die Proben wurden bei 105°C über Nacht getrocknet. Dann wurden die Proben mit einer Kugelmühle gemahlen, aufgeschlossen und auf ihren Ag-Gesamtgehalt überprüft (siehe Abschnitt 4.6.2). Die Mittelwerte mit Standardabweichung aus diesem Versuch sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Verteilung von NM-300K in Boden nach Applikation über Trägermaterial**

Soll-Gehalt [mg/kg TM Boden]	Ag-Gehalt [mg/kg TM Boden] <sup>a</sup>	WF <sup>b</sup> [%]	Stabw. <sup>c</sup> [%]
15	13,4	89,5	14,5
120	107,6	89,6	4,4

<sup>a</sup> Mittelwert aus 6 Proben; <sup>b</sup> Wiederfindung; <sup>c</sup> Standardabweichung

Die Wiederfindung bei beiden Gehalten liegt bei ca. 90%. Die Standardabweichung befindet sich in einem Bereich von 14,5 bei 15 mg/kg TM Boden und 4,4 bei 120 mg/kg TM Boden. Aufgrund der guten Wiederfindungsrate von 90% und den nur geringen Standardabweichungen wurde die Applikationsmethodik als geeignet erachtet und für alle weiteren Versuche mit Boden durchgeführt.

### 5.1.2 Stabilität der NM-300K Stammsuspension

Zu Beginn der Durchführung von Kläranlagensimulationen wurde überprüft, über welchen Zeitraum die Stammsuspension von NM-300K, bei einer Konzentration von 10 mg/L, stabil bleibt. Dieser Ansatz wurde in zwei Replikaten durchgeführt.

Der PE-Behälter in dem die Stammsuspension gelagert wurde, wurde in vier Segmente unterteilt. Die NM-300K Stammlösung wurde entsprechend der Beschreibung aus 4.3.1 angesetzt. Nach der Behandlung im Ultraschallbad wurde

die Flasche geöffnet und die entsprechende Menge NM-300K entnommen, um eine Stammsuspension von 10 mg/L in sechs Litern herzustellen. In einem PE-Gefäß mit einem Volumen von 6,4 L wurden zunächst 2 L destilliertes Wasser vorgelegt und die Menge an NM-300K hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde mit vier Litern destilliertem Wasser aufgefüllt, in einem Kühlschrank platziert und bei 4°C gelagert. Nach drei Stunden wurde eine Probe von 20 mL aus jedem der vier Segmente entnommen. Jeweils 24 Stunden später wurden weitere Proben entnommen. Alle Proben wurden mit 1% konzentrierter HNO<sub>3</sub> versetzt, chemisch aufgeschlossen und der Ag-Gehalt der Proben wurde bestimmt.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse aus diesem Versuch dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass sich innerhalb von 24 Stunden ein Gleichgewicht einstellt. In Behälter 1 ist die Schwankung der Ag Konzentration zum Zeitpunkt der ersten Probenahme noch sehr groß. In der obersten Schicht konnten Ag-Konzentrationen von 16,5 mg/L gemessen werden. In den drei Segmenten darunter lag die Konzentration an Ag zwischen 9,0 und 11,6 mg/L. Im Vergleich dazu wurden in Behälter 2 nach drei Stunden Werte zwischen 8,9 und 9,8 mg/L gemessen (Tabelle 7). Die Schwankungen waren hier wesentlich geringer. Nach 24 Stunden hatte sich in beiden Behältern ein Gleichgewicht eingestellt. Die Ag-Konzentration in Behälter 1 lag zwischen 9,0 und 11,4 mg/L, die aus Behälter 2 bei 8,4 bis 12,3 mg/L. Auch nach 48 Stunden war die Stammsuspension immer noch sehr stabil, Wiederfindungen in einem Bereich von 99 bis 103% bei Behälter 1 und 86 bis 93% bei Behälter 2 (Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnis zur Untersuchung der Stabilität der NM-300K Stammsuspension

			Nach 3 Stunden		Nach 24 Stunden		Nach 48 Stunden	
	Einzel-segmente	Soll-Konzentration [mg/L]	Gemessene Konzentration [mg/L]	WF <sup>a</sup> [%]	Gemessene Konzentration [mg/L]	WF <sup>a</sup> [%]	Gemessene Konzentration [mg/L]	WF <sup>a</sup> [%]
<b>Behälter 1</b>	H1	10	16,5	165	10,0	100	10,0	100
	H2	10	11,6	116	10,9	109	10,3	103
	H3	10	9,0	90	9,0	90	10,3	103
	H4	10	10,8	108	11,4	114	9,9	99
<b>Behälter 2</b>	H1	10	8,9	89	8,5	85	9,3	93
	H2	10	9,3	93	12,3	123	9,0	90
	H3	10	8,9	89	8,4	84	8,6	86
	H4	10	9,8	98	8,4	84	9,0	90

<sup>a</sup>Wiederfindung

### 5.1.3 Abbauversuch mit NM-300K DIS

Mit Hilfe des manometrischen Respirationstests wurde untersucht, ob der Dispersant NM-300K DIS über 28 Tage abgebaut wurde. Hierzu wurde die Strukturformel von NM-300K DIS ( $C_{109}H_{208}O_{32}$ ) festgelegt und das Volumen an Testgegenstand berechnet, das einem Kohlenstoffgehalt von 50 mg/L entspricht. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 8 dargestellt.

Der Testgegenstand wurde mit Mineralmedium und Klärschlamm der Kläranlage Schmallingenberg bei  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  über 28 Tage inkubiert und der Sauerstoffbedarf kontinuierlich aufgezeichnet. Zusätzlich wurde ein Gefäß, das Mineralmedium und Klärschlamm beinhaltete, als Blindwert untersucht. Die Validitätskriterien des Versuchs wurden alle erfüllt. Die Referenzsubstanz Natriumbenzoat wurde zu 94,6% abgebaut und die Abbauraten in den Parallelansätzen mit dem Testgegenstand unterschieden sich um weniger als 20%. Zusätzlich war der Referenzgegenstand Natriumbenzoat innerhalb der ersten 14 Tage um 60% abgebaut und der Abbau in der Toxizitätskontrolle lag über 25%. Auch der pH-Wert, der zu Versuchsbeginn und -ende in den Versuchsgefäßen bestimmt wurde, lag nicht außerhalb einer Spanne von 6,0 bis 8,5 (Tabelle 8). In dem Abbauversuch mit NM-300K DIS zeigte sich, dass der Dispersant nach 28 Tagen zu 91,9% abgebaut war.

**Tabelle 8: Ergebnisse des Abbauversuchs mit NM-300K DIS**

	<b>Dispersant NM-300K DIS</b>	<b>Referenzsubstanz Natriumbenzoat</b>	<b>Toxizitäts- kontrolle</b>
<b>Abbau [%]</b>	91,9	94,6%	95,1%
<b>Abweichung in Parallelansätzen [%]</b>	3,4	0,0%	2,1
<b>pH-Wert zu Versuchsbeginn</b>	7,3	7,2	7,3
<b>pH-Wert zu Versuchsende</b>	6,3	7,6	6,6

## 5.2 C-Transformation

Die Wirkung von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  auf die mikrobielle Biomasse im RefeSol 01A wurde untersucht. Die Untersuchung wurde nach drei Stunden, 7 Tagen und 28 Tagen durchgeführt. Es wurden drei Replikate je Kontrolle (mit und ohne Dispersant bei NM-300K) und Gehalt des Testgegenstandes angesetzt. Dabei wurden

Bodengehalte von 0,56 / 1,67 / 5,0 und 15,0 mg/kg TM für NM-300K untersucht. Bei AgNO<sub>3</sub> kam ein Bodengehalt von 0,19 mg/kg TM hinzu. Die Versuche wurden wie in 4.4.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Einzelnen in Tabelle 9 und Tabelle 10, die berechnete NOEC und EC<sub>x</sub>-Werte wurden in Tabelle 11 dargestellt. In beiden durchgeführten Versuchen wurde das Kriterium der Validität (Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle ≤ 15%) erfüllt.

**Tabelle 9: Ergebnisse der C-Transformation mit NM-300K**

Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM Boden] ± Stabw. <sup>a</sup>	Variationskoeffizient [%]	Hemmung zur Kontrolle [%]
<b>3 Stunden</b>			
Kontrolle	97,3 ± 12,7	13,0	-
Kontrolle (Dispersant)	104,7 ± 12,7	12,1	-7,5
0,56	90,0 ± 0	0	7,5
1,67	90,0 ± 0	0	7,5
5,0	90,0 ± 0	0	7,5
15,0	97,3 ± 12,7	13,0	0
<b>7 Tagen</b>			
Kontrolle	112,0 ± 0	0	-
Kontrolle (Dispersant)	97,3 ± 12,7	13,0	13,1
0,56	67,3 ± 22,5	22,5	39,9*
1,67	52,0 ± 26,0	50,0	53,6**
5,0	59,7 ± 12,7	21,3	46,7*
15,0	30,0 ± 260	86,6	73,2**
<b>28 Tagen</b>			
Kontrolle	67,0 ± 0	0	-
Kontrolle (Dispersant)	67,0 ± 0	0	0
0,56	59,7 ± 12,7	21,3	10,9
1,67	59,7 ± 12,7	21,3	10,9
5,0	29,7 ± 13,3	44,8	55,7**
15,0	14,7 ± 12,7	86,6	78,1***

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Tabelle 10: Ergebnisse der C-Transformation mit AgNO<sub>3</sub>

Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM Boden] ± Stabw. <sup>a</sup>	Variationskoeffizient [%]	Hemmung zur Kontrolle [%]
<b>3 Stunden</b>			
Kontrolle	112 ± 0	0	-
0,19	89,7 ± 22,5	25,1	19,9*
0,56	58,0 ± 0	0	48,2***
1,67	36,5 ± 17,7	48,4	67,4***
5,0	45,0 ± 0	0	59,8***
15,0	26,0 ± 0	0	76,8***
<b>7 Tagen</b>			
Kontrolle	59,7 ± 12,7	21,3	-
0,19	59,7 ± 12,7	21,3	0
0,56	67,0 ± 0	0	-12,3
1,67	67,0 ± 0	0	-12,3
5,0	74,7 ± 34,2	45,7	-25,1
15,0	29,7 ± 12,3	44,8	50,3*
<b>28 Tagen</b>			
Kontrolle	46,7 ± 1,2	2,5	-
0,19	67,0 ± 0	0	-43,6***
0,56	56,5 ± 16,3	28,8	-21,1
1,67	52,7 ± 13,3	25,2	-12,9
5,0	52,3 ± 12,7	24,3	-12,1
15,0	45,0 ± 0	0	3,6

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 11: NOEC-, EC<sub>10</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte in den Versuchen zur Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im C-Transformationstest**

		NOEC [mg/kg TM]	EC <sub>10</sub> [mg/kg TM]	EC <sub>50</sub> [mg/kg TM]
Versuchsbeginn	NM-300K	> 15,0	n.b.	n.b.
	AgNO <sub>3</sub>	< 0,19	n.b.	1,1 [n.b. – 32,2]
Nach 7 Tagen	NM-300K	< 0,56	n.b.	2,0 [n.b.]
	AgNO <sub>3</sub>	5,0	2,5 [n.b.]	25,6 [n.b.]
Nach 28 Tagen	NM-300K	1,67	1,0 [n.b.]	5,0 [n.b.]
	AgNO <sub>3</sub>	n.b.	n.b. [n.b.]	n.b. [n.b.]

[x] 95% Vertrauensintervall; n.b.: nicht bestimmbar

### Wirkung von NM-300K

Im Versuch mit NM-300K wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und der Kontrolle mit dem Dispersanten nach 28 Tagen festgestellt. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden somit auf die Kontrolle ohne Dispersant bezogen. Bei der ersten Messung der mikrobiellen Biomasse nach drei Stunden konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den mit NM-300K kontaminierten Böden aufgezeigt werden. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen zeigten sich eine Verringerung der Biomasse und eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung. Die Verringerung der Biomasse lag in einem Bereich von 39,9% bei dem niedrigsten Gehalt bis 73,2% bei dem höchsten Gehalt an NM-300K im Boden (Tabelle 9). Dies führte zu einer EC<sub>50</sub> von 2,0 mg/kg TM Boden (Tabelle 11). Nach 28 Tagen war die Hemmung in den beiden niedrigeren Gehalten auf jeweils 10,9% zurückgegangen, während sie in den beiden höheren Gehalten auf 55,7 und 78,1% angestiegen war (Tabelle 9). Dies führte zu einer EC<sub>50</sub> von 5,0 mg/kg TM Boden. Die NOEC am Ende des Versuchs lag bei einem Gehalt an NM-300K von 1,67 mg/kg TM Boden (Tabelle 11).

### Wirkung von AgNO<sub>3</sub>

Im Versuch mit AgNO<sub>3</sub> wurde nach einer Inkubationszeit von drei Stunden eine statistisch signifikante Hemmung der mikrobiellen Biomasse in allen Replikaten gemessen. Es zeigte sich eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung mit einer Hemmung von 19,9% bei einem Gehalt von 0,2 mg/kg TM Boden aufsteigend bis zu 76,8% bei 15

mg/kg TM Boden (Tabelle 10). Die  $EC_{50}$  wurde mit 1,1 mg/kg TM Boden berechnet (Tabelle 11). Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen zeigte sich ein vollkommen verändertes Bild. Bei Gehalten von 0,56 bis 5,0 mg/kg TM Boden zeigte sich eine mit dem Gehalt steigende Zunahme der Biomasse von 12,3 bis 25,1%, welche allerdings keine statistische Signifikanz hatte (Tabelle 10). Nur in dem höchsten Gehalt an  $AgNO_3$  im Boden wurde eine signifikante Hemmung gemessen. Diese lag bei 50,3% im Vergleich mit der Kontrolle. Eine  $EC_{50}$  von 25,6 mg/kg TM wurde anhand der Ergebnisse extrapoliert (Tabelle 11). Nach 28 Tagen zeigte sich ein verändertes Bild. In allen  $AgNO_3$  haltigen Replikaten kam es zu einer Zunahme der Biomasse im Vergleich zur Kontrolle. Mit steigendem Gehalt an  $AgNO_3$  im Boden nahm die Zunahme der Biomasse jedoch ab. Die Biomasse in der Kontrolle und dem höchsten Gehalt an  $AgNO_3$  war mit Werten von 46,7 und 45,0 mg Cmik / kg TM Boden vergleichbar. Bei einem Bodengehalt an  $AgNO_3$  von 0,19 mg/kg TM Boden war die Stimulation im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant. Die Hemmung der mikrobiellen Biomasse, wie noch nach 7 Tagen gemessen, war nach 28 Tagen nicht mehr vorhanden. Stattdessen hatte sich die mikrobielle Biomasse hier an die der Kontrolle angepasst. Eine NOEC ließ sich am Ende des Versuchs mit  $AgNO_3$  aufgrund der umgekehrten Gehalts-Wirkungs-Beziehung nicht berechnen.

### 5.3 Potentielle Ammoniumoxidation

Die Wirkung von NM-300K und  $AgNO_3$  auf die Gruppe der Nitrifikanten wurde über den Abbau von Ammonium bzw. der potentiellen Ammoniumoxidation untersucht. Die Untersuchung des Ammoniumabbaus wurde nach 24 Stunden, 7 Tagen und 28 Tagen durchgeführt. Es wurden drei Replikate je Kontrolle (mit und ohne Dispersant bei NM-300K) und Bodengehalt des Testgegenstandes angesetzt. Dabei wurden Bodengehalte von 0,56 / 1,67 / 5,0 und 15,0 mg/kg TM für NM-300K und zusätzlich ein Gehalt von 0,19 mg/kg TM bei  $AgNO_3$  untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben. Der Ammoniumabbau ist als Nitritproduktion in Tabelle 12 (NM-300K) und Tabelle 13 ( $AgNO_3$ ) dargestellt, berechnete NOEC und  $EC_{10}$ - bzw.  $EC_{50}$ -Werte wurden in Tabelle 14 dokumentiert. In beiden durchgeführten Versuchen wurde das Kriterium der Validität (Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle  $\leq 15\%$ ) erfüllt.

In dem Versuch mit NM-300K wurde nach einer Inkubationszeit von 28 Tagen eine statistisch signifikante Hemmung der Nitritproduktion der Bodenmikroorganismen von

11,8% durch den Dispersanten festgestellt (Tabelle 12). Die Zugabe des Dispersanten auf den Versuchsboden führte zum ersten Messzeitpunkt zu einer leichten Stimulation der Nitrifikanten. Nach 7 Tagen war die Nitritproduktion der Nitrifikanten in den Kontrollen mit und ohne Dispersant nahezu gleich. Im Folgenden wurden die Ergebnisse aufgrund der Hemmung durch den Dispersanten nach 28 Tagen, entsprechend auf die Kontrolle mit Dispersanten bezogen.

**Tabelle 12: Ergebnisse der potentiellen Ammoniumoxidation mit NM-300K**

Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> -N/g TM * h] ± Stabw. <sup>a</sup>	Variationskoeffizient [%]	Hemmung zur Kontrolle mit Dispersant [%]
<b>24 Stunden</b>			
Kontrolle	61,4 ± 2,3	3,7	-
Kontrolle (Dispersant)	66,6 ± 2,9	4,3	-
0,56	56,0 ± 4,6	8,3	16,0*
1,67	49,9 ± 4,3	8,6	25,1***
5,0	24,9 ± 2,5	9,8	62,8***
15,0	9,4 ± 0,4	4,6	85,9***
<b>7 Tagen</b>			
Kontrolle	60,9 ± 2,3	3,7	-
Kontrolle (Dispersant)	60,1 ± 3,0	5,0	-
0,56	54,2 ± 0,8	1,4	9,8**
1,67	43,2 ± 3,3	7,5	28,2***
5,0	4,8 ± 3,3	67,8	92,0***
15,0	0 ± 0	-	100,0***
<b>28 Tagen</b>			
Kontrolle	70,8 ± 1,7	2,5	-
Kontrolle (Dispersant)	62,5 ± 5,2	8,3	-
0,56	50,9 ± 2,8	5,4	18,5***
1,67	34,1 ± 2,7	8,0	45,4***
5,0	4,0 ± 1,6	41,0	93,6***
15,0	0,6 ± 0,7	118,6	99,0***

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Tabelle 13: Ergebnisse der potentiellen Ammoniumoxidation mit AgNO<sub>3</sub>

Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Nitritbildung [ng NO <sub>2</sub> -N/g TM * h] ± Stabw. <sup>a</sup>	Variations- koeffizient [%]	Hemmung zur Kontrolle [%]
<b>24 Stunden</b>			
Kontrolle	46,1 ± 6,8	14,7	-
0,19	51,3 ± 2,6	5,0	-11,2
0,56	44,8 ± 1,4	3,1	3,0
1,67	34,4 ± 2,2	6,3	25,5*
5,0	13,1 ± 3,0	22,7	71,5***
15,0	4,2 ± 3,5	83,4	90,9***
<b>7 Tagen</b>			
Kontrolle	43,6 ± 3,0	6,9	-
0,19	52,1 ± 2,6	3,5	-19,4**
0,56	45,1 ± 3,6	8,1	-3,3
1,67	36,0 ± 4,0	11,2	17,5**
5,0	15,5 ± 1,2	7,5	64,4***
15,0	4,3 ± 1,3	29,6	90,1***
<b>28 Tagen</b>			
Kontrolle	30,3 ± 3,1	10,2	-
0,19	31,0 ± 4,3	13,9	-2,2
0,56	32,8 ± 4,8	14,7	-8,2
1,67	25,5 ± 3,4	13,4	16,1*
5,0	5,4 ± 3,9	72,2	82,4***
15,0	0,9 ± 1,7	200,0	97,2***

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 14: NOEC-, EC10- und EC50-Werte in den Versuchen zur Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> bei der Potentiellen Ammoniumoxidation**

		NOEC [mg/kg TM]	EC <sub>10</sub> [mg/kg TM]	EC <sub>50</sub> [mg/kg TM]
Versuchsbeginn	NM-300K	< 0,56	0,6 [0,0 – 1,3]	3,4 [1,6 – 7,8]
	AgNO <sub>3</sub>	0,56	0,9 [0,6 – 1,2]	3,1 [2,6 – 3,7]
Nach 7 Tagen	NM-300K	< 0,56	1,1 [n.b. – 1,7]	2,3 [1,1 – n.b.]
	AgNO <sub>3</sub>	n.b.	1,2 [0,8 – 1,5]	3,8 [3,2 – 4,4]
Nach 28 Tagen	NM-300K	< 0,56	0,5 [0,0 – 1,0]	1,6 [0,5 – 4,8]
	AgNO <sub>3</sub>	0,56	1,4 [1,2 – 1,6]	2,9 [2,7 – 3,2]

[x] 95% Vertrauensintervall; n.b.: nicht bestimmbar

### Wirkung von NM-300K

Im Versuch mit NM-300K wurde die Nitritproduktion der Nitrifikanten an allen Messzeitpunkten mit steigendem Gehalt an NM-300K im Boden gehemmt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden ab einem Bodengehalt von 0,56 mg/kg TM Boden gefunden. Die hemmende Wirkung in den Bodengehalten von 1,67 bis 15 mg/kg TM Boden wurde mit zunehmender Versuchsdauer stärker. Die Hemmung bei 1,67 mg/kg TM Boden stieg z.B. von 25,1% nach 24 Stunden auf 28,2% nach 7 Tagen und 45,4% am Testende (Tabelle 12). Entsprechend senkte sich die EC<sub>50</sub> von 3,4 auf 2,3 und letztlich 1,6 mg/kg TM Boden. Die NOEC lag am Testende bei einem Gehalt an NM-300K im Boden von < 0,56 mg/kg TM Boden (Tabelle 14).

### Wirkung von AgNO<sub>3</sub>

Im Versuch mit AgNO<sub>3</sub> wurde bei Gehalten von 0,19 und 0,56 mg/kg TM Boden keine Hemmung der Nitritproduktion ermittelt. Stattdessen zeigte sich an allen Messpunkten eine Stimulation der Produktion an Nitrit aus Ammonium, die allerdings nur nach 7 Tagen bei 0,19 mg/kg TM Boden mit 19,4% eine statistische Signifikanz hatte (Tabelle 13).

Die Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> zu Testbeginn ist vergleichbar. Bei AgNO<sub>3</sub> zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in der Produktionsleistung bei Bodengehalten von 1,67 bis 15 mg/kg TM Boden. Es wurde eine Hemmung von 25,5 bis 90,9% in diesem Gehaltsbereich ermittelt (Tabelle 13). Bei NM-300K lagen die Hemmungen zum Zeitpunkt des Testbeginns bei 25,1 bis 85,9% (Tabelle 12). Die

Hemmung, die von  $\text{AgNO}_3$  zu Testbeginn ausging, änderte sich im Verlauf des Versuches nur noch gering. Die  $\text{EC}_{50}$  lag bei Werten von 3,1 (Testbeginn), 3,8 (7 Tage) und 2,9 mg/kg TM Boden (Testende). Die NOEC lag zu Versuchsende bei einem Gehalt an  $\text{AgNO}_3$  im Boden von 0,56 mg/kg TM Boden (Tabelle 14).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung von NM-300K über den Zeitraum von 28 Tagen zunahm, während die Wirkung von  $\text{AgNO}_3$  zu allen drei Messzeitpunkten vergleichbar war. Bei Betrachtung der  $\text{EC}_{10}$  und  $\text{EC}_{50}$  Werte für NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  zeigt sich, dass diese zu jedem Messzeitpunkt in einem Bereich liegen.

#### 5.4 Regenwurm Reproduktionstest

Untersucht wurde die Wirkung von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  auf den Kompostwurm *Eisenia andrei*. Nach 28 Tagen wurden die Mortalität und die Veränderung der Biomasse bestimmt, nach 56 Tagen wurde die Anzahl der Juvenilen betrachtet. Je 8 Replikate für die Kontrolle und 4 Replikate für die Kontrolle mit Dispersant und die verschiedenen Ag-Gehalte wurden angesetzt. Im ersten Versuch mit NM-300K wurden Ag-Gehalte im Boden von 60 / 120 und 200 mg/kg TM Boden untersucht. In den anderen Versuchen mit NM-300K und mit  $\text{AgNO}_3$  wurden Ag-Gehalte im Boden von 15 / 30 / 60 / 120 und 200 mg/kg TM Boden untersucht. Die Versuche wurden alle wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben durchgeführt.

Die Versuche mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  wurden jeweils zweimal durchgeführt und erfüllten die Validitätskriterien der OECD Richtlinie 222. In jedem der Replikate der Kontrolle wurden am Ende des Versuchs  $\geq 30$  Juvenile gefunden. Der Variationskoeffizient der Reproduktion lag in den Kontrollgefäßen dabei bei  $\leq 30\%$ . Nach den ersten vier Wochen des Versuchs wurde die Mortalität der Adulten bestimmt, welche zu diesem Zeitpunkt in allen Versuchen in den Kontrollgefäßen  $\leq 10\%$  war. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  im Regenwurm Reproduktionstest sind in Tabelle 15 dargestellt. In Tabelle 16 sind die daraus resultierenden  $\text{EC}_{10^-}$ ,  $\text{EC}_{20^-}$ ,  $\text{EC}_{50^-}$  und NOEC-Werte zusammengefasst.

Tabelle 15: Ergebnisse des Regenwurm Reproduktionstest mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>

Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Mortalität [%]	Änderung der Biomasse [%]	Mittlere Anzahl der Juvenilen ± Stabw. <sup>a</sup>	Stabw. <sup>a</sup> [%]	Hemmung auf Kontrolle [%]	Hemmung auf Kontrolle Dispersant [%]
Versuch 1 (NM-300K)						
Kontrolle	0	36	347 ± 27	7.8	-	-
Dispersant	0	39	329 ± 4	1.1	5.2	-
60	0	49*	186 ± 22	11.6	46.4***	43.5***
120	0	43*	147 ± 24	16.4	57.6***	55.3***
200	0	46*	86 ± 18	21.4	75.2***	73.8***
Versuch 2 (NM-300K)						
Kontrolle	0	40	341 ± 26	7.6	-	-
Dispersant	0	36	268 ± 45	16.8	21.5**	-
15	0	62*	252 ± 31	12.3	26.3***	6.2
30	0	61*	209 ± 46	22.0	38.9***	22.1**
60	0	61*	220 ± 30	13.6	35.7***	18.1*
120	0	67*	158 ± 18	11.4	53.7***	41.0***
200	0	63*	97 ± 26	26.8	71.7***	64.0***
Versuch 3 (AgNO <sub>3</sub> )						
Kontrolle	0	36	347 ± 27	7.8	-	-
15	0	57*	261 ± 24	9.4	24.9*	-
30	0	55*	202 ± 17	8.2	41.8*	-
60	0	59*	158 ± 28	17.9	54.4*	-
120	0	56*	107 ± 16	15.2	69.1*	-
200	0	54*	64 ± 21	32.5	81.5*	-
Versuch 4 (AgNO <sub>3</sub> )						
Kontrolle	0	27	240 ± 14	5.7	-	-
15	0	52*	183 ± 17	9.5	23.9*	-
30	0	53*	121 ± 13	10.5	49.6*	-
60	7.5	43*	120 ± 7	5.4	49.9*	-
120	0	57*	69 ± 4	6.0	71.5*	-
200	15.0	35*	18 ± 5	25.3	92.5*	-

<sup>a</sup>: Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 16: NOEC-, EC<sub>10</sub>-, EC<sub>20</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte aus den Regenwurm Reproduktionstests mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>**

		Regenwurm Reproduktionstest; Endpunkt Reproduktion			
		NOEC [mg/kg TM]	EC <sub>10</sub> [mg/kg TM]	EC <sub>20</sub> [mg/kg TM]	EC <sub>50</sub> [mg/kg TM]
NM-300K	Versuch 1 <sup>a</sup>	<60	n.b. [n.b.]	n.b. [n.b.]	74,3 [n.b.]
	Versuch 1 <sup>b</sup>	<60	n.b. [n.b.]	n.b. [n.b.]	83,0 [n.b.]
	Versuch 2 <sup>a</sup>	<15	n.b. [n.b.]	10,7 [0,01 – 28,1]	80,0 [33,6 – 413,3]
	Versuch 2 <sup>b</sup>	15	24,2 [0,2 – 50,7]	44,8 [2,4 – 78,0]	146,0 [85,7 – 741,4]
AgNO <sub>3</sub>	Versuch 3	<15	n.b. [n.b.]	10,9 [7,8 – 14,0]	46,9 [40,7 – 53,6]
	Versuch 4	<15	n.b. [n.b.]	11,4 [0,3 – 24,5]	42,0 [15,2 – 83,5]

<sup>a</sup> Vergleich zur Kontrolle; <sup>b</sup> Vergleich zur Kontrolle mit Dispersant, [x] 95% Vertrauensintervall, n.b. nicht bestimmbar

Zu Beginn konnte in allen Versuchen innerhalb der ersten 24 Stunden ein Fluchtverhalten der adulten Würmer bei Ag-Gehalten im Boden von 120 und 200 mg/kg TM Boden beobachtet werden. Die Würmer versuchten dabei den Versuchsboden zu meiden und das Versuchsgefäß zu verlassen. Dieses Verhalten war in den Replikaten der Dispersantkontrolle nicht zu beobachten. Einen Tag später zeigte sich dieses Fluchtverhalten nicht mehr, wobei zu beobachten war, dass die Würmer vermehrt in der dünnen nicht kontaminierten Futterschicht auf der Oberfläche des Versuchsbodens zu finden waren. Dieses Verhalten konnte sowohl in den Versuchen mit NM-300K als auch in den Versuchen mit AgNO<sub>3</sub> bis zur Entnahme der adulten Würmer nach 28 Tagen beobachtet werden.

#### Wirkung von NM-300K

In beiden Versuchen mit NM-300K wurde keine Mortalität bei den adulten Würmern festgestellt. Die Biomasse der adulten Würmer nahm innerhalb der ersten 28 Tage zu. Eine vergleichbare Zunahme der Biomasse war sowohl bei den Würmern in der Kontrolle (36 – 40%) als auch bei denen der Kontrolle mit Dispersant (36 – 39%) zu verzeichnen. In den Replikaten mit NM-300K ergab sich bei der Zunahme der Biomasse ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (Versuch 1: 43 – 49%; Versuch 2: 61 – 67%), welcher nicht abhängig vom Gehalt an NM-300K im Boden war (Tabelle 15).

Aus Tabelle 15 ist die Anzahl der juvenilen Würmer in den Versuchen mit NM-300K, gezählt nach 56 Tagen, zu entnehmen. Im ersten Versuch wurde die Reproduktion der Würmer durch den Dispersanten nicht beeinflusst. Der Unterschied zwischen Kontrolle ohne und mit Dispersant lag bei 5,2% und war statistisch nicht signifikant (Tabelle 15). In den Replikaten mit NM-300K ergaben sich bei der Reproduktion signifikante Unterschiede im Vergleich zu den beiden Kontrollen in Abhängigkeit vom Gehalt an NM-300K im Boden. Die Hemmung der Reproduktion betrug im Vergleich zur Kontrolle 46,4% bei dem niedrigsten Gehalt an NM-300K und 75,2% bei dem höchsten Gehalt (Tabelle 15). Dies führte zu  $EC_{50}$  Werten für die Reproduktion von *E. andrei* von 74,3 mg/kg TM Boden im Vergleich zur Kontrolle und 83,0 mg/kg TM Boden im Vergleich zur Dispersantkontrolle. Die NOEC lag bei diesem Versuch für den Endpunkt der Reproduktion bei einem Bodengehalt von < 60 mg/kg TM Boden (Tabelle 16).

Im zweiten Versuch mit den NM-300K wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der juvenilen Würmer in der Kontrolle (341 Juvenile) und in der Kontrolle mit dem Dispersanten (268 Juvenile) festgestellt. Die Zugabe des Dispersanten führte zu einer Hemmung der Reproduktion von 21,5%. Die Standardabweichung lag bei 7,6% in der Kontrolle und 16,8% in der Dispersantkontrolle (Tabelle 15). Aufgrund dieser Hemmung wurde die Wirkung von NM-300K sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch im Vergleich zur Kontrolle mit Dispersant dargestellt. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde dies in Tabelle 15 und Tabelle 16 auch für den ersten Versuch, in dem der Dispersant keine Wirkung gezeigt hatte, dargestellt.

Auch im zweiten Versuch mit NM-300K zeigte sich eine starke Hemmung der Reproduktion in Abhängigkeit vom Gehalt an NM-300K im Boden. Im Vergleich zur Kontrolle lag die Hemmung der Reproduktion in diesem Versuch zwischen 26,3% bei dem niedrigsten Gehalt und 71,7% bei dem höchsten Gehalt (Tabelle 15). Für den Endpunkt der Reproduktion ergab sich entsprechend eine  $EC_{50}$  von 80,0 mg/kg TM Boden im Vergleich zur Kontrolle, welcher vergleichbar ist mit dem  $EC_{50}$  des ersten Versuches. Bei einer Berechnung auf Grundlage der Dispersantenkontrolle ergab sich eine  $EC_{50}$  von 146,0 mg/kg TM Boden. Es ergab sich für die Reproduktion eine NOEC von  $\leq 15$  mg/kg TM Boden (Tabelle 16).

### Wirkung von AgNO<sub>3</sub>

In den beiden Versuchen mit AgNO<sub>3</sub> zeigte sich im ersten Versuch keine Mortalität bei den adulten Würmern. Im zweiten Versuch ergab sich eine Mortalität bei den adulten Würmern von 7,5% bei einem Ag-Gehalt von 60 mg/kg TM Boden und von 15% bei 200 mg/kg TM Boden, die statistisch nicht signifikant war (Tabelle 15). Auch bei AgNO<sub>3</sub> konnte, wie schon bei den Ag-NP gezeigt, eine Zunahme der Biomasse der adulten Würmer über den Zeitraum von 28 Tagen beobachtet werden. In Versuch 1 mit AgNO<sub>3</sub> betrug die Zunahme der Biomasse 36%, während sie bei den Replikaten mit verschiedenen Ag-Gehalten unabhängig vom Gehalt zwischen 54% und 59% lag (Tabelle 15). Diese Ergebnisse wurden im zweiten Versuch bestätigt.

Auch bei der Wirkung auf die Reproduktion von *E. andrei* ergaben sich bei AgNO<sub>3</sub> Effekte in Abhängigkeit vom Gehalt, welche nur wenig toxischer waren, als die von NM-300K. Im ersten Versuch ergab sich eine Abnahme der Anzahl der juvenilen Würmer im Vergleich zur Kontrolle von dem niedrigsten Ag-Gehalt (261 Juvenile, 24,9% Hemmung) bis zum höchsten Ag-Gehalt (64 Juvenile, 81,5% Hemmung) (Tabelle 15), woraus eine EC<sub>50</sub> von 46,9 mg/kg TM Boden resultiert (Tabelle 16). Im zweiten Versuch ergaben sich vergleichbare Werte, wiederum in Abhängigkeit von den Ag-Gehalten im Boden, mit einer EC<sub>50</sub> von 42,0 mg/kg TM Boden. Die NOEC für die Reproduktion von *E. andrei* lag in beiden Versuchen bei einem Gehalt von < 15 mg/kg TM Boden (Tabelle 16).

### Messung des Gehalts an Ag in Regenwürmern

Die adulten Würmer aus jeweils dem zweiten Regenwurm Reproduktionstest mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurden an Tag 28 aus dem Versuch entnommen. Das Gewicht wurde festgestellt und die Würmer aller Replikate von jedem Bodengehalt wurden zusammen über Nacht in einer Polyethylenbox auf feuchtem Filterpapier entkotet. Am nächsten Tag wurden sie aus den Boxen entnommen und in 50 mL Vials abgefüllt. Bis zur Probenvorbereitung und anschließenden Messung wurden die Würmer bei -21°C im Tiefkühlschrank gelagert.

Die Würmer wurden wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben aufgeschlossen und im Anschluss auf den Gesamtsilbergehalt untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 17 dargestellt. In den Kontrollen mit und ohne Dispersant wurde kein Silber gemessen. Die Proben der mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> exponierten

Würmer wiesen hingegen Silber auf. Der Ag-Gehalt in den Würmern aus dem Versuch mit NM-300K lag in einem Bereich von 7,0 mg/kg TM Wurm bei einem Bodengehalt von 15 mg/kg Boden bis 11,3 mg/kg TM Wurm bei 120 mg/kg TM Boden (Tabelle 17). Die Messungen ergaben einen statistisch signifikanten Unterschied beim Vergleich des Messwertes bei einem Gehalt von 15 mg/kg TM Boden mit den Messwerten aller weiteren Gehalte. In dem Versuch mit AgNO<sub>3</sub> wurde ein Ag-Gehalt von 8,0 mg/kg TM Wurm bei einem Bodengehalt von 15 mg/kg TM Boden ermittelt (Tabelle 17). Mit steigendem Ag-Gehalt im Boden zeigte sich eine Abnahme des Ag-Gehaltes im Wurm. Auch in dem Versuch mit AgNO<sub>3</sub> ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich des Ag-Gehaltes im Wurm bei einem Ag-Gehalt im Boden von 15 mg/kg TM und mit dem bei 200 mg/kg TM Boden.

**Tabelle 17: Gemessener Ag-Gehalt in *Eisenia andrei* aus den Reproduktionsversuchen**

	NM-300K	AgNO <sub>3</sub>
Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Mittlerer Ag Gehalt im Wurm [mg/kg TM] ± Stabw. <sup>a</sup>	Mittlerer Ag Gehalt im Wurm [mg/kg TM] ± Stabw. <sup>a</sup>
15	7.0 ± <0.01	8.0 ± 0.9
30	10.5 ± 0.4*	7.3 ± 1.5
60	11.1 ± 0.2*	6.8 ± 0.4
120	11.3 ± 0.4*	6.7 ± 0.2
200	11.2 ± 0.1*	5.9 ± 0.1*

<sup>a</sup> Standardabweichung; Statistische Signifikanz im Vergleich zu Messwert bei 15 mg/kg TM Boden:  
\* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

#### Messung des Gehalts an freien Ag-Ionen im Bodenporenwasser

Die Menge an freien Ag-Ionen (Ag<sup>+</sup>) im Bodenporenwasser repräsentiert den bioverfügbaren Teil von NM-300K und AgNO<sub>3</sub>. Die Messungen von Ag<sup>+</sup> im Bodenporenwasser wurden mit Hilfe der DGT Technik durchgeführt (4.6.1). Der Anteil an Ag<sup>+</sup> wurde in allen Versuchen für die Kontrolle (ohne Dispersant) und die Bodengehalte von 60 / 120 und 200 mg/kg TM Boden bestimmt. Die Messwerte sind in Tabelle 18 als Menge an Ag<sup>+</sup> in ng Ag<sup>+</sup> / kg TM Boden und als prozentualer Anteil der Ag-Ionen an den nominalen Bodengehalten dargestellt. Bei der folgenden

Ergebnisdarstellung stellen die Versuche 1 und 2 jene mit NM-300K und die Versuche 3 und 4 jene mit AgNO<sub>3</sub> dar.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl in dem Versuch mit NM-300K als auch in dem mit AgNO<sub>3</sub> nur etwa 0,0001% des nominalen Ag-Gehaltes im Boden als frei verfügbare Ag<sup>+</sup> vorliegen. Der restliche Anteil an NM-300K bzw. AgNO<sub>3</sub> scheint durch Sorption an Bodenpartikel und –bestandteile nicht mehr verfügbar. Freie Ag<sup>+</sup> konnten in der Kontrolle nicht gemessen werden und es wurden nur geringfügige Unterschiede zwischen dem Anteil an freien Ionen in den Versuchen mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> festgestellt.

Der Anteil an frei verfügbaren Ag<sup>+</sup> an den ersten beiden Messzeitpunkten (Versuchstag 0 und 26) war in allen Versuchen vergleichbar. In den Versuchen 1, 2 und 4, zeigte sich ein vom steigenden nominalen Bodengehalt abhängiger Anstieg an Ag<sup>+</sup>. In Versuch 1 (NM-300K) zum Beispiel stieg der Anteil an freien Ag<sup>+</sup> von 22,1 auf 73,4 ng/kg TM Boden und in Versuch 4 (AgNO<sub>3</sub>) von 31,7 auf 60,6 ng/kg TM Boden (Tabelle 18). Gleichzeitig war kein proportionaler Anstieg des prozentualen Anteils der freien Ag<sup>+</sup> zu dem nominalen Gehalt an Ag im Boden zu verzeichnen. Stattdessen sank der prozentuale Anteil leicht ab (Versuch 2 und 4) oder lag auf einem Niveau (Versuch 1). In Versuch 3 war der Anstieg der freien Ag-Ionen in Abhängigkeit vom Ag-Gehalt im Boden nicht zu verzeichnen.

An dem dritten Messzeitpunkt (Versuchstag 54) wurde der höchste Anteil an frei verfügbaren Ag<sup>+</sup> nicht in dem höchsten Gehalt an Ag im Boden gemessen, sondern lag hier bei einem Gehalt von 120 mg/kg TM Boden. Bei diesem Bodengehalt wurde ein Anteil an freien Ag-Ionen von 151,8 ng/kg TM Boden in Versuch 2 mit NM-300K und 103,8 ng/kg TM Boden in Versuch 4 mit AgNO<sub>3</sub> gemessen (Tabelle 18).

Tabelle 18: Messungen der freien Ag-Ionen im Bodenporenwasser via DGT Technik

		Versuch 1 [NM-300K]		Versuch 2 [NM-300K]		Versuch 3 [AgNO <sub>3</sub> ]		Versuch 4 [AgNO <sub>3</sub> ]	
Versuchstag	Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Ag-Ionen [ng/kg TM]	% zu nominal Konzentration (x 10 <sup>-4</sup> )	Ag-Ionen [ng/kg TM]	% zu nominal Konzentration (x 10 <sup>-4</sup> )	Ag-Ionen [ng/kg TM]	% zu nominal Konzentration (x 10 <sup>-4</sup> )	Ag-Ionen [ng/kg TM]	% zu nominal Konzentration (x 10 <sup>-4</sup> )
<b>D0</b>	Kontrolle	0,4	-	0,2	-	0,4	-	0,2	-
	60	22,1	0,37	20,1	0,34	39,1	0,65	31,7	0,53
	120	43,8	0,36	28,8	0,24	34,9	0,29	37,7	0,31
	200	73,4	0,37	32,3	0,16	91,8	0,46	60,6	0,30
<b>D26</b>	Kontrolle	0,7	-	0,6	-	0,7	-	0,4	-
	60	25,3	0,42	27,3	0,46	8,4	0,14	40,6	0,68
	120	34,9	0,29	45,1	0,38	24,6	0,20	56,8	0,47
	200	59,3	0,30	45,6	0,23	18,3	0,09	58,3	0,29
<b>D54</b>	Kontrolle	1,2	-	1,4	-	1,2	-	0,8	-
	60	24,3	0,40	63,8	1,06	38,9	0,65	61,1	1,02
	120	46,7	0,39	151,8	1,27	87,4	0,73	103,8	0,86
	200	31,5	0,16	94,2	0,47	70,9	0,35	88,7	0,44

## 5.5 Regenwurm Fluchttest

Die Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Regenwurm Fluchttest mit *Eisenia andrei* wurde untersucht. Ziel war es herauszufinden, ab welchem Bodengehalt an NM-300K bzw. AgNO<sub>3</sub> Würmer in der Lage sind, Silber wahrzunehmen, nachdem sich in den Regenwurm Reproduktionstests gezeigt hatte, dass die Tiere bei relativ hohen Gehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Boden versuchten aus dem Testgefäß zu gelangen. Die Wirkung definierte sich in diesem Versuch darüber, ob sich die Würmer über 48 Stunden Versuchsdauer homogen über das Testgefäß verteilten, oder ob sie vor dem Testgegenstand in das Segment mit Kontrollboden flüchteten und einen Repellenteffekt zeigten.

Sowohl für die Kontrollen als auch für die verschiedenen Ag-Gehalte im Boden wurden jeweils fünf Replikate angesetzt. Es wurden Ag-NP Gehalte von 1,2 / 3,7 / 11 / 33 und 100 mg/kg TM Boden untersucht. Für AgNO<sub>3</sub> wurden die Gehalte von 6,25 / 12,5 / 25 und 50 mg/kg TM getestet. Neben NM-300K wurde auch der Dispersant entsprechend des höchsten Gehaltes an NM-300K im Boden überprüft. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in 4.4.5 beschrieben. Der pH-Wert des Bodens wurde in 0,01M Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) Lösung gemessen und betrug in allen Replikaten 5,0. Durch die Zugabe des Testgegenstandes änderte sich der pH-Wert nicht. Die Ergebnisse der Versuche sind Tabelle 19 zu entnehmen.

### Wirkung von NM-300K

Im Regenwurm Fluchttest mit NM-300K zeigte sich, dass der Dispersant keinen negativen Einfluss auf die Würmer hat. Es wurden mehr Tiere (6,4) in den Gefäßen mit Dispersant als in denen ohne (3,6) gefunden (Tabelle 19). Bei den Gehalten von NM-300K stellt sich schon ab dem niedrigsten Gehalt eine Wirkung ein, die mit steigendem Gehalt immer stärker wird. Bei einem Gehalt von 1,2 mg/kg TM Boden ist das Verhältnis Kontrolle zu NM-300K mit 6,3 zu 3,7 Tieren noch ausgeglichen. Bei allen höheren Ag-NP Gehalten ist ein klares Fluchtverhalten zu erkennen. In dem höchsten Ag-NP Gehalt im Boden von 100 mg/kg TM lassen sich nur noch 0,3 Tiere in dem Segment mit Ag-NP finden (Tabelle 19).

### Wirkung von AgNO<sub>3</sub>

Auch in dem Versuch mit AgNO<sub>3</sub> war ein Fluchtverhalten der Würmer in die Kammer mit Kontrollboden zu erkennen. Es zeigte sich ein Repellenteffekt für AgNO<sub>3</sub> schon

ab einem Ag-Gehalt von 6,25 mg/kg TM Boden. Die Würmer befanden sich bei diesem Bodengehalt schon nahezu vollständig in dem Segment mit Kontrollboden. Bei 50 mg/kg TM Boden wurden alle Tiere im Kontrollboden wiedergefunden.

**Tabelle 19: Ergebnisse des Regenwurm Fluchttest mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>**

Testgegenstand	Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Anzahl Testtiere in Kontrollsegment	Anzahl Testtiere in Prüfsegment
<b>NM-300K</b>	Kontrolle	4,1	5,9
	Kontrolle Dispersant	3,6	6,4
	1,2	6,3	3,7
	3,7	8	2
	11	9,2	0,8
	33	9,3	0,7
	100	9,7	0,3
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Kontrolle	4,8	5,2
	6,25	9,5	0,5
	12,5	9,5	0,5
	25,0	9,9	0,1
	50,0	10	0

## 5.6 Pflanzenwachstum

Es wurde die Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf das Pflanzenwachstum von *Phaseolus aureus* L. (Bohne) und *Avena sativa* L. (Hafer) untersucht. Die Versuche wurden mit je sechs Replikaten pro Kontrolle (mit und ohne Dispersant bei Ag-NP) und jeweils vier Replikaten pro Gehalt des Testgegenstandes angesetzt. Es wurden Gehalte von 0,1 / 1,0 / 10,0 und 100,0 mg/kg TM Boden untersucht. Die Dauer des Versuchs betrug 14 Tage. Regelmäßig wurden die Pflanzen gewässert und auf Chlorosen und Nekrosen untersucht. Die Versuche wurden wie in Abschnitt 4.4.6 beschrieben durchgeführt.

Nach der Durchführung der ersten Versuche wurde ein weiterer Versuch zur Validierung der Ergebnisse zur Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf das Pflanzenwachstum der Bohne *Phaseolus aureus* L. angesetzt. In diesem Versuch wurden Bodengehalte von 1,5 / 4,5 / 13,5 / 40,5 und 121,5 mg/kg TM Boden

untersucht. Die Versuche wurden mit je sechs Replikaten für die Kontrolle, vier Replikaten für die Kontrolle mit Dispersant und jeweils vier Replikaten pro Bodengehalt des Testgegenstandes angesetzt.

In allen Versuchen wurden die Validitätskriterien erfüllt. In allen Replikaten der Kontrolle waren insgesamt mehr als 70% der Samen aufgegangen und die Mortalität der aufgegangenen Keimlinge betrug weniger als 10%. Allgemein zeigte sich, dass die Keimrate von *Phaseolus aureus* L. wesentlich besser ist als die von *Avena sativa* L. In Tabelle 20 (NM-300K), Tabelle 21 (AgNO<sub>3</sub>) und Tabelle 22 (Validierung) sind die Ergebnisse aus den Versuchen dargestellt. Die berechneten EC<sub>x</sub>- und NOEC-Werte aus den ersten Versuchen mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>, die in Tabelle 23 dargestellt sind, liefern aufgrund der breiten Spreizung (Faktor 10) der untersuchten Bodengehalte eine geringe statistische Genauigkeit. Nichtsdestotrotz sind sie für eine Abschätzung der Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Pflanzenwachstumstest geeignet.

**Tabelle 20: Ergebnisse des Pflanzentest mit NM-300K**

Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Keimrate [%]	Mortalität [%]	Frischgewicht [g / Testgefäß] ± Stabw. <sup>a</sup>	Hemmung Pflanzenwachstum [%]
<b><i>Phaseolus aureus</i> L.</b>				
Kontrolle	100	3,3	4,174 ± 0,800	-
Kontrolle Dispersant	100	0	5,493 ± 1,133	-
0,1	100	0	5,358 ± 0,536	2,5
1	100	0	4,026 ± 0,789	26,7**
10	100	0	5,650 ± 0,841	-2,9
100	100	0	2,725 ± 0,213	50,4***
<b><i>Avena sativa</i> L.</b>				
Kontrolle	76,7	0	5,049 ± 1,225	-
Kontrolle Dispersant	73,3	0	5,224 ± 1,442	-
0,1	85,0	0	6,135 ± 0,181	-17,5
1	85,0	0	5,084 ± 0,510	2,7
10	80,0	0	5,065 ± 0,884	3,0
100	95,0	0	1,620 ± 0,238	69,0***

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Tabelle 21: Ergebnisse des Pflanzentest mit AgNO<sub>3</sub>

Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Keimrate [%]	Mortalität [%]	Frischgewicht [g / Testgefäß] ± Stabw. <sup>a</sup>	Hemmung Pflanzenwachstum [%]
<b>Phaseolus aureus L.</b>				
Kontrolle	100	0	5,764 ± 0,464	-
0,1	100	0	5,815 ± 0,531	-0,9
1	100	0	6,105 ± 0,327	-5,9
10	100	0	4,919 ± 0,440	14,7**
100	95	0	1,473 ± 0,373	74,7***
<b>Avena sativa L.</b>				
Kontrolle	100	0	5,124 ± 0,454	-
0,1	80	0	4,117 ± 0,761	19,7*
1	90	0	4,421 ± 0,892	13,7
10	95	0	5,297 ± 0,640	-3,4
100	90	0	1,291 ± 0,384	74,8***

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Tabelle 22: Ergebnisse Validierungsversuchs mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>

Testgegenstand	Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Keimrate [%]	Mortalität [%]	Frischgewicht [g / Testgefäß] ± Stabw. <sup>a</sup>	Hemmung Pflanzenwachstum [%]
<b>NM-300K</b>	Kontrolle	90	0	5,268 ± 1,102	-
	Kontrolle Dispersant	100	0	5,996 ± 0,236	-13,8
	1,5	95	0	5,374 ± 0,937	-2,0
	4,5	100	0	4,181 ± 0,956	20,6*
	13,5	100	0	5,405 ± 0,786	-2,6
	40,5	100	0	3,655 ± 0,199	30,6**
	121,5	100	0	2,436 ± 0,254	53,8***
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Kontrolle	90	0	5,268 ± 1,102	-
	1,5	100	0	5,386 ± 0,578	-2,2
	4,5	100	0	6,336 ± 0,572	-20,3*
	13,5	100	0	5,507 ± 0,609	-4,5
	40,5	100	0	4,104 ± 0,684	22,1**
	121,5	100	5	1,002 ± 0,148	81,0***

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 23: NOEC-, EC<sub>25</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte aus dem Pflanzenwachstumstest mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>**

		Pflanzenwachstumstest; Endpunkt Frischgewicht		
		NOEC [mg/kg TM]	EC <sub>25</sub> [mg/kg TM]	EC <sub>50</sub> [mg/kg TM]
NM-300K	Bohne (Versuch 1)	10	20,1	158,3
	Bohne (Versuch 2)	1,5	33,5	106,6
	Hafer	10	32,1 [10,3 – 47,8]	61,8 [37,0 – 78,2]
AgNO <sub>3</sub>	Bohne (Versuch 1)	1	16,1 [15,3 – 16,9]	40,4 [39,0 – 41,8]
	Bohne (Versuch 2)	1,5	43,2 [41,9 – 44,5]	67,7 [66,1 – 69,3]
	Hafer	n.b.	10,9	44,9

[x] 95% Vertrauensintervall, n.b.: nicht bestimmbar

### Wirkung von NM-300K

In dem Versuch mit NM-300K betrug die Keimrate von *Phaseolus aureus* L. in allen Replikaten 100%. Ebenso zeigte sich keine statistisch signifikante Mortalität bei den gekeimten Pflanzen und auch Chlorosen und Nekrosen konnten nicht festgestellt werden. Beim Vergleich der beiden Kontrollen zeigte sich, dass die Kontrolle mit dem Dispersanten ein wesentlich stärkeres Pflanzenwachstum aufwies, wobei dieses nicht statistisch signifikant war. Das Wachstum in den Replikaten mit Dispersant war um 31,5% stärker als in den Replikaten ohne Dispersant. Die Hemmung, hervorgerufen durch die verschiedenen Gehalte an NM-300K im Boden, wurde daher auf die Kontrolle mit Dispersant bezogen.

Bei Gehalten an NM-300K von 1 und 100 mg/kg TM Boden ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede. Das Wachstum von *Phaseolus aureus* L. wurde um 26,7 bzw. 50,4% gehemmt (Tabelle 20). Bei Gehalten von 0,1 und 10 mg/kg TM Boden zeigte sich keine signifikante Hemmung des Pflanzenwachstums. Es ergab sich eine EC<sub>50</sub> für das Pflanzenwachstum bei *Phaseolus aureus* L. von 158,3 mg/kg TM nach Extrapolation (Tabelle 23).

In dem Versuch mit *Avena sativa* L. lag die Keimrate zwischen 73,3 (Kontrolle mit Dispersant) und 95% (100 mg/kg TM Boden) (Tabelle 20). Keine der aufgegangenen Pflanzen wurde über die Dauer des Versuchs als „tot“ gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kontrollen wurden in dem Versuch mit *Avena*

*sativa* L. nicht festgestellt. Dennoch wurden auch in diesem Versuch die Wirkungen der verschiedenen Gehalte an NM-300K im Vergleich zu der Kontrolle mit Dispersanten berechnet. Hierbei zeigte sich eine schwache Gehalts-Wirkungs-Beziehung. Bei dem niedrigsten Gehalt von 0,1 mg/kg TM Boden ergab sich eine Stimulation des Pflanzenwachstums von 17,5% (Tabelle 20), die jedoch nicht signifikant war. In den beiden folgenden Gehalten von 1 und 10 mg/kg TM Boden passte sich das Pflanzenwachstum dem der Kontrolle mit Dispersanten an. Bei 100 mg/kg TM Boden wurde eine Hemmung des Wachstums von 69,0% ermittelt (Tabelle 20). Dies führte zu einer  $EC_{50}$  von 61,8 mg/kg TM Boden und einer NOEC von 10 mg/kg TM Boden (Tabelle 23).

#### Wirkung von $AgNO_3$

Bei dem Versuch zur Wirkung von  $AgNO_3$  auf das Wachstum von *Phaseolus aureus* L. lag die Keimrate bei allen Kontrollen und Gehalten mit Ausnahme des höchsten Ag-Gehaltes (95%) bei 100%. Eine Mortalität der aufgegangenen Pflanzen wurde nicht verzeichnet. Es ergab sich eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung in diesem Versuch bei dem Pflanzenwachstum. Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle ergab sich ab einem Gehalt von 10 mg/kg TM Boden mit 14,7% bis zu einer Hemmung des Pflanzenwachstums von 74,4% bei dem höchsten Gehalt (Tabelle 21). Hieraus resultierte eine  $EC_{50}$  für das Pflanzenwachstum von *Phaseolus aureus* L. von 40,4 mg/kg TM Boden und einer NOEC von 1,0 mg/kg TM Boden (Tabelle 23).

In dem Versuch zur Wirkung von  $AgNO_3$  auf *Avena sativa* L. ergab sich eine Keimrate von 80% (0,1 mg/kg TM Boden) bis 100% (Kontrolle). Auch hier ergab sich keine Mortalität bei den aufgegangenen Pflanzen. Ein statistisch signifikanter Unterschied im Pflanzenwachstum ergab sich bei einem Ag-Gehalt im Boden von 0,1 und 100 mg/kg TM Boden mit 19,7 bzw. 74,8% Hemmung (Tabelle 21). Die  $EC_{50}$  für das Pflanzenwachstum lag bei 44,9 mg/kg TM Boden (Tabelle 23).

#### Validierungsversuch mit *Phaseolus aureus* L.

Der Versuch zur Wirkung von NM-300K und  $AgNO_3$  auf das Pflanzenwachstum von *Phaseolus aureus* L. wurde wiederholt. Die Wiederholung wurde durchgeführt, da sich in dem ersten Versuch mit NM-300K eine Stimulation des Pflanzenwachstums in der Kontrolle mit Dispersanten gezeigt hatte. Zusätzlich waren Hemmungen und

Stimulationen festgestellt worden, denen keine Gehalts-Wirkungs-Beziehung zu Grunde lag. In diesem Versuch wurde eine engere Spreizung der Bodengehalte von 3,0 gewählt.

Die Keimrate von *Phaseolus aureus* L. lag bei allen Kontrollen und Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> zwischen 90% und 100%. Eine geringe Mortalität der aufgegangenen Pflanzen von 5% wurde lediglich bei einem Bodengehalt an AgNO<sub>3</sub> von 121,5 mg/kg TM Boden verzeichnet. Chlorosen und Nekrosen konnten zu keinem Zeitpunkt des Versuchs festgestellt werden. Beim Vergleich der beiden Kontrollen zeigte sich, dass die Kontrolle mit dem Dispersanten in diesem Versuch die Unterschiede aus dem ersten Versuch nicht mehr aufwies. Die Hemmung, hervorgerufen durch die verschiedenen Gehalte an NM-300K im Boden, wurde auf die Kontrolle bezogen.

Bei einem Bodengehalt an NM-300K von 4,5 mg/kg TM Boden ergab sich eine Hemmung des Pflanzenwachstums. Diese Hemmung zeigte sich im nächst höheren Bodengehalt von 13,5 mg/kg TM Boden nicht. Ab einem Bodengehalt von 40,5 mg/kg TM Boden kam es zu einer starken Hemmung des Pflanzenwachstums von 30,6%, die sich auf 53,8% bei einem Bodengehalt von 121,5 mg/kg TM Boden steigerte (Tabelle 22). Es ergab sich eine EC<sub>50</sub> für das Pflanzenwachstum bei *Phaseolus aureus* L. von 106,6 mg/kg TM Boden. Die NOEC lag bei einem Bodengehalt von 1,5 mg/kg TM Boden (Tabelle 23).

Bei einem Bodengehalt an AgNO<sub>3</sub> von 4,5 mg/kg TM Boden ergab sich eine signifikante Stimulation des Pflanzenwachstums von 20,3%. Diese Stimulation zeigte sich im nächst höheren Bodengehalt von 13,5 mg/kg TM Boden nicht mehr. Ab einem Bodengehalt von 40,5 mg/kg TM Boden kam es zu einer Hemmung des Pflanzenwachstums von 22,1%, die sich auf 81,0% bei einem Bodengehalt von 121,5 mg/kg TM Boden steigerte (Tabelle 22). Aufgrund der nicht vorhandenen Wirkung von AgNO<sub>3</sub> bei einem Bodengehalt von 13,5 mg/kg TM Boden und der damit nicht eindeutigen Gehalts-Wirkungs-Beziehung, ergab sich eine EC<sub>50</sub> für das Pflanzenwachstum bei *Phaseolus aureus* L. von 67,7 mg/kg TM Boden. Die NOEC lag bei einem Bodengehalt von 1,5 mg/kg TM Boden (Tabelle 23).

## 5.7 Atmungshemmtest

Der Atmungshemmtest nach OECD Richtlinie 209 wurde durchgeführt, um zunächst die Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die Atmungsaktivität der Mikroorganismen im Belebtschlamm zu untersuchen. Der Sauerstoffabbau über 10 Minuten wurde gemessen und über die lineare Phase wurde die Atmungsaktivität berechnet. Es wurde jeweils ein Replikat pro Kontrolle, Konzentration und Referenzmaterial angesetzt. Getestet wurden Konzentrationen von 1 / 3 / 9 / 27 / 50 / 81 und 100 mg/L sowohl für NM-300K als auch AgNO<sub>3</sub>. Für das Referenzmaterial 3,5-Dichlorphenol wurden Konzentrationen von 4 / 12 und 36 mg/L untersucht. Die Durchführung der Versuche erfolgte wie in Abschnitt 4.4.7 beschrieben.

In allen dargestellten Versuchen wurden die Validitätskriterien (Varianz der Kontrollen: I. Abweichung vom Mittelwert  $\leq 7,5\%$ ; II. Abweichung  $K_{\min}$  von  $K_{\max} \leq 15\%$ ) erfüllt. Die EC<sub>50</sub> für 3,5-Dichlorphenol als Referenzsubstanz musste in einem Bereich von 5 bis 30 mg/L liegen. Auch dieses Kriterium wurde in den Versuchen jeweils erfüllt. In den angegebenen Ergebnistabellen wird die Hemmung immer im Vergleich zu der ersten angegebenen Kontrolle dargestellt. Die Kontrolle am Ende der Tabelle soll lediglich die Validität aufzeigen. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse aus dem Versuch mit NM-300K und dem mit AgNO<sub>3</sub> dargestellt, in Tabelle 25 die Ergebnisse aus dem Validierungsversuch und in Tabelle 26 die berechneten NOEC und EC<sub>x</sub>-Werte.

Tabelle 24: Ergebnis der Atmungshemmtests mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>

Konzentration [mg/L]	NM-300K		AgNO <sub>3</sub>	
	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> /(L*h)]	Hemmung der Respiration [%]	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> /(L*h)]	Hemmung der Respiration [%]
<b>Kontrolle</b>	10,8	-	22,8	-
<b>1</b>	13,3	-29,1	22,2	6,7
<b>3</b>	12,3	-19,4	5,7	76,1*
<b>9</b>	12,9	-25,2	1,9	92,0*
<b>27</b>	9,6	6,8	1,4	94,1*
<b>50</b>	3,2	68,9*	0	100*
<b>81</b>	0,8	92,2*	0	100,0*
<b>100</b>	0,0	100,0*	0	100,0*
	3,5-Dichlorphenol		3,5-Dichlorphenol	
<b>4</b>	7,9	23,3	16,3	31,5
<b>12</b>	3,0	70,9*	10,4	56,3
<b>36</b>	1,1	89,3*	3,5	85,3
<b>Kontrolle</b>	10,2	5,6	24,4	-7,0

\* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Tabelle 25: Ergebnis des Validierungsversuches mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>

	Konzentration [mg/L]	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> /(L*h)]	Hemmung der Respiration [%]
	Kontrolle	25,6	
<b>NM-300K</b>	25	23,0	9,3
	50	18,3	27,8*
	100	5,8	77,1**
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	1	21,7	14,4*
	2	18,8	25,8*
	4	5,4	78,7**
<b>3,5-Dichlorphenol</b>	4	20,2	20,3*
	12	9,4	62,9**
	36	4,8	81,1**
	Kontrolle	25,1	2,0

\* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Tabelle 26: NOECs und EC<sub>50</sub> aus den Atmungshemmtests mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>

	Atmungshemmtest; Endpunkt Respiration			
	NOEC [mg/L]	EC <sub>10</sub> [mg/L]	EC <sub>20</sub> [mg/L]	EC <sub>50</sub> [mg/L]
<b>NM-300K (Versuch 1)</b>	≤ 9	27,9 [24,0 – 30,9]	32,4 [28,9 – 35,0]	43,0 [40,5 – 45,3]
<b>NM-300K (Validierung)</b>	n.b.	32,2	41,4	67,1
<b>3,5-Dichlorphenol</b>	n.b.	2,2	3,4	7,7
<b>AgNO<sub>3</sub> (Versuch 2)</b>	< 1	1,1	1,4	2,1
<b>AgNO<sub>3</sub> (Validierung)</b>	n.b.	1,3	1,6	2,7
<b>3,5-Dichlorphenol</b>	n.b.	n.b.	2,5	8,6

[x] 95% Vertrauensintervall, n.b. nicht bestimmt

### Wirkung von NM-300K

Im Versuch mit NM-300K zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung der Respirationsrate schon ab 50 mg/L mit einer Hemmung von 68,9% (Tabelle 24). Bei einer Konzentration von 100 mg/L war keine Respiration mehr messbar. Anhand der Ergebnisse wurde eine EC<sub>50</sub> für NM-300K im Atmungshemmtest von 43,0 mg/L berechnet (Tabelle 26). Bei 3,5-Dichlorphenol als Referenzsubstanz zeigte sich eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Die Hemmung der Respiration stieg von 4 mg/L mit 23,3% auf 89,3% bei einer Konzentration von 36 mg/L (Tabelle 24). Dies führte zu einer EC<sub>50</sub> von 7,7 mg/L und erfüllte somit die Validitätskriterien, wonach die EC<sub>50</sub> der Referenzsubstanz zwischen 5 und 30 mg/L liegen muss (Tabelle 26).

### Wirkung von AgNO<sub>3</sub>

In dem ersten Versuch mit AgNO<sub>3</sub> zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung der Respirationsrate schon ab 3 mg/L mit einer Hemmung von 76,1%. Bei einer Konzentration von 50 mg/L war keine Respiration mehr messbar (Tabelle 24). Anhand der Ergebnisse wurde eine EC<sub>50</sub> für AgNO<sub>3</sub> im Atmungshemmtest von 2,1 mg/L berechnet (Tabelle 26). Bei 3,5-Dichlorphenol als Referenzsubstanz zeigte sich eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Die Hemmung der Respiration stieg von 4 mg/L mit 31,5% auf 85,3% bei einer Konzentration von 36 mg/L (Tabelle 24). Dies führte zu einer EC<sub>50</sub> von 8,6 mg/L und erfüllte somit die Validitätskriterien, wonach die EC<sub>50</sub> der Referenzsubstanz zwischen 5 und 30 mg/L liegen muss (Tabelle 26).

### Validierungsversuch mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>

Zur Validierung der Ergebnisse aus den ersten beiden Versuchen wurde ein dritter Versuch mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> mit einer verminderten Anzahl an Konzentrationen durchgeführt. Für NM-300K wurden in diesem Versuch Konzentrationen von 25 / 50 und 100 mg/L und für AgNO<sub>3</sub> von 1 / 2 und 4 mg/L im Atmungshemmtest untersucht. Es zeigte sich für NM-300K eine statistisch signifikante Hemmung der Respirationsrate ab 50 mg/L mit einer Hemmung von 27,8%. Bei der höchsten Konzentration von 100 mg/L war die Respiration um 77,1% vermindert (Tabelle 25). Anhand der Ergebnisse wurde eine EC<sub>50</sub> für NM-300K im Atmungshemmtest von 67,1 mg/L berechnet (Tabelle 26). Für AgNO<sub>3</sub> ergab sich eine statistisch signifikante Hemmung der Respirationsrate ab 1 mg/L mit einer Hemmung von 14,4%. Auch hier zeigte sich eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Bei der höchsten Konzentration von 100 mg/L war die Respiration um 78,7% vermindert (Tabelle 25). Anhand der Ergebnisse wurde eine EC<sub>50</sub> für AgNO<sub>3</sub> im Atmungshemmtest von 2,7 mg/L berechnet (Tabelle 26). Bei 3,5-Dichlorphenol als Referenzsubstanz zeigte in dieser Validierung eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Die Hemmung der Respiration stieg von 4 mg/L mit 20,3% auf 81,1% bei einer Konzentration von 36 mg/L (Tabelle 25). Dies führte zu einer EC<sub>50</sub> von 9,6 mg/L und erfüllte somit die Validitätskriterien (Tabelle 26).

### **5.8 Kläranlagensimulation**

In diesen Versuchen wurde die Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die Reinigungsleistung einer Kläranlage, speziell auf die Abbauleistung in der Nitrifikationsstufe, untersucht. Ziel war es herauszufinden, ob sich Ergebnisse, die im Atmungshemmtest erzielt wurden, auch auf die Kläranlagensimulationen übertragen lassen. Zusätzlich sollte betrachtet werden, ob es bei einer Anreicherung von Silber im Klärschlamm über die Dauer des Versuchs zu einer Wirkung auf die Mikroorganismen kommt. Die Kläranlagensimulationen wurden gemäß OECD Richtlinie 303a durchgeführt. Bei der Planung der Versuche wurden die Ergebnisse, die zuvor im Atmungshemmtest erzielt wurden, berücksichtigt. Die Konzentrationen wurden entsprechend den EC<sub>50</sub> Konzentrationen des Atmungshemmtests ausgewählt. Der Dispersant hatte im Atmungshemmtest keine Wirkung auf die Abbauleistung der Mikroorganismen und wurde nicht weiter betrachtet.

Während der Durchführung des Versuchs wurden täglich Proben mit einem Volumen von 20 mL des Ein- und Auslaufes der Kläranlagen sowie der Stammlösungen entnommen. Diese Proben wurden teilweise auf ihren Ag-Gehalt untersucht, um eine Bilanzierung des Verbleibs von NM-300K bzw.  $\text{AgNO}_3$  in der Kläranlage zu ermöglichen. Wie in Abschnitt 4.4.8 beschrieben wurden in regelmäßigen Abständen der pH-Wert von Einlauf, Auslauf und im Nitrifikationsbecken, der TS-Gehalt des Klärschlammes sowie der Gehalt an Nitrat, Nitrit und Ammonium im Ein- und Auslauf bestimmt.

#### Kläranlagensimulation mit $\text{AgNO}_3$

In dieser Kläranlagensimulation wurde die Wirkung von  $\text{AgNO}_3$  auf die Mikroorganismen der Kläranlage betrachtet. In diesem Versuch wurde nur die Nitrifikationsstufe simuliert. Abweichend von der Beschreibung in Abschnitt 4.4.8 wurden die Stammlösung und das synthetische Abwasser separat voneinander in die Nitrifikation dosiert. Das Schlauchsystem wurde erst in der zweiten Kläranlagensimulation mit NM-300K angewandt. Die Dosierung der  $\text{AgNO}_3$  Stammlösung und des synthetischen Abwassers erfolgte hier direkt in das Nitrifikationsbecken mit sofortiger Durchmischung der einzelnen Substanzen. Der Versuch wurde mit einer Kontrolle und drei Konzentrationen an  $\text{AgNO}_3$  durchgeführt. Die nominalen Einlaufkonzentrationen lagen bei 1 / 2 und 4 mg/L. Die  $\text{AgNO}_3$  Stammlösungen und das synthetische Abwasser wurden jeweils 10fach konzentriert angesetzt, aus einem Kühlschrank bei 4°C dosiert und nach drei Tagen jeweils gewechselt.

Zunächst wurde in die Kläranlagen synthetisches Abwasser, 1:10 verdünnt mit Leitungswasser, über drei Tage mit einer Durchflussrate von 750 mL/h eingeleitet. Nach drei Tagen wurde der Klärschlamm aus allen Anlagen zur Synchronisierung vereint, durchmischt und wieder auf die Kläranlagen verteilt. Nachdem eine DOC-Elimination von  $\geq 80\%$  erreicht wurde, wurde mit der Dosierung der  $\text{AgNO}_3$  Stammlösung über eine Dauer von 10 Tagen begonnen.

Die Messungen des pH-Wertes, des TS-Gehaltes und der Wasserchemie zu den jeweiligen Kläranlagen wurde in Tabelle 57 (siehe Kapitel 13.1, Anhang) zusammengefasst. Bei einem TS-Gehalt über 3 g/L wurde jeweils ein Teil des Klärschlammes aus dem Nitrifikationsbecken entnommen, mit dem Ziel einen TS-

Gehalt von 2,5 g/L zu erreichen. Der pH-Wert des synthetischen Abwassers wurde bei einem Wert von  $7,5 \pm 0,5$  gehalten, wodurch der pH-Wert des Einlaufs ebenfalls in diesem Bereich lag. Der Gehalt an Ammonium, Nitrat und Nitrit wurde regelmäßig im Auslauf der Kläranlagen gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Konzentration an Ammonium in Kläranlage 4 im Vergleich mit den anderen Anlagen deutlich erhöht war. Dies deutet auf eine Hemmung der Nitrifikanten im Klärschlamm hin.

Die Einlaufwerte des DOC lagen zu Beginn des Versuchs in allen Anlagen in einem Bereich von 130 bis 180 mg/L, bei einem Sollwert von ca. 100 mg/L (Tabelle 58, Kapitel 13.1, Anhang). Der Anteil an Pepton, Harnstoff und Fleischextrakt wurde kontinuierlich innerhalb der Vorlaufphase und der ersten vier Tage der Haupttestphase herabgesetzt, um den DOC-Gehalt auf einen Wert zwischen 100 und 120 mg/L einzustellen. Von Tag 4 der Haupttestphase an war die Konzentration dieser Inhaltsstoffe um 20% abgesenkt worden. Die DOC-Elimination im Verlauf der Kläranlagensimulation ist in Tabelle 58 wiedergegeben und in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

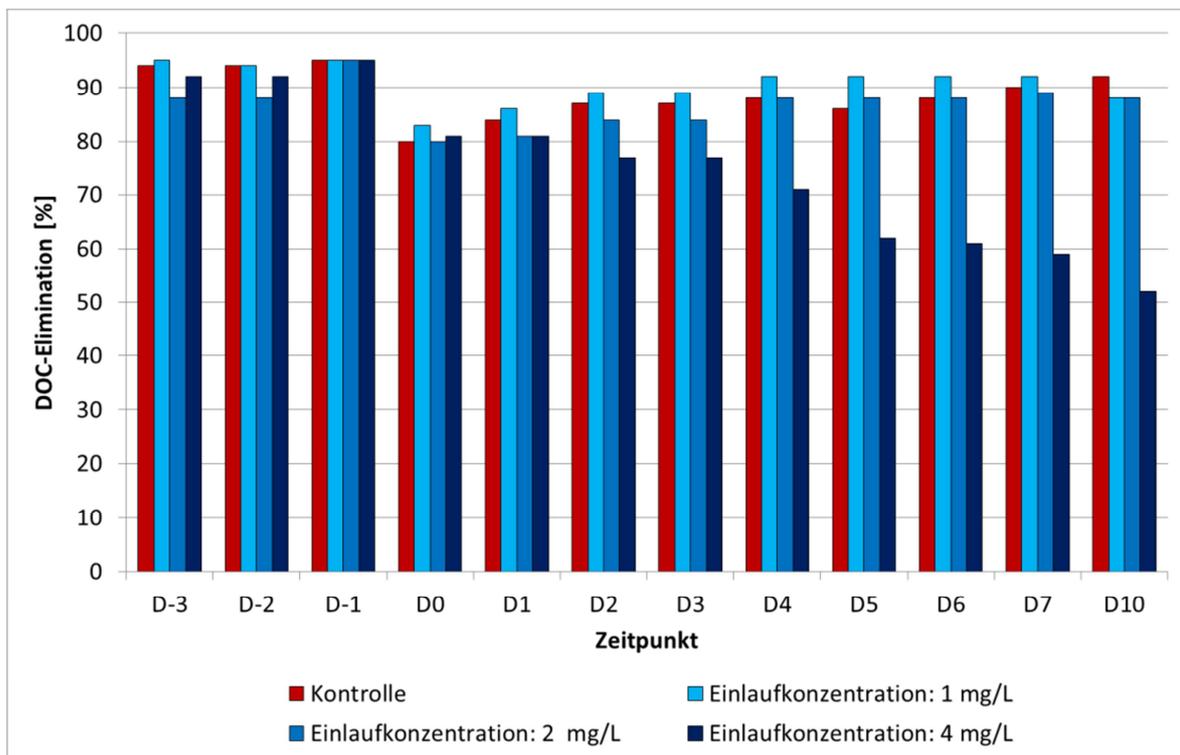


Abbildung 5: Kläranlagensimulation mit  $\text{AgNO}_3$  - DOC-Elimination

Nach der Synchronisation der Anlagen und dem Beginn der Dosierung von  $\text{AgNO}_3$  Stammlösung wurde zunächst eine Verringerung der DOC-Elimination festgestellt. Die Elimination lag allerdings in allen Anlagen bei einem Wert von  $\geq 80\%$ . Dieser Rückgang war auch bei der Kontrollanlage zu verzeichnen. Ein Effekt hervorgerufen durch die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  kann somit ausgeschlossen werden.

In der Kontrollanlage ohne Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  stieg die DOC-Elimination durch die Mikroorganismen des Klärschlammes mit zunehmender Versuchsdauer von 80% auf 92% am Ende des Versuchs (Tabelle 58). Ein vergleichbarer Anstieg der DOC-Elimination war auch in Anlage 2 mit einer Einlaufkonzentration von 1 mg/L und in Anlage 3 (Einlaufkonzentration: 2 mg/L) zu beobachten. In Anlage 2 stieg die DOC-Elimination von 83% an Tag 0 auf 92% an Tag 7 und nahm dann leicht ab auf 88%. Bei Anlage 3 lag die DOC-Elimination an Tag 0 ebenfalls bei 80% und stieg im Laufe des Versuchs auf 88% (Tag 10) an (Tabelle 58). Ein verändertes Bild zeigte sich in der Anlage mit der höchsten Einlaufkonzentration von 4 mg/L. Hier ergab sich eine DOC-Elimination an Tag 0 von 81%, die mit fortschreitender Dauer des Versuchs kontinuierlich bis Tag 10 auf 52% absank (Tabelle 58). Bei Betrachtung der Kläranlagen in die  $\text{AgNO}_3$  dosiert wurde, zeigte sich, dass nach spätestens drei Tagen eine dunkle Färbung des Klärschlammes festzustellen war, die über die Dauer des Versuchs zu schwarz umschlug.

#### *Bilanzierung des Verbleibs von $\text{AgNO}_3$ in der Kläranlage*

Zur Untersuchung des Verbleibs von  $\text{AgNO}_3$  in den Kläranlagen wurden Einlauf- und Auslaufproben jeder Anlage an vier Zeitpunkten auf ihren Ag-Gehalt untersucht. Die untersuchten Zeitpunkte (Tag 0 / 1 / 5 und 7) repräsentieren den gesamten Versuchszeitraum, wodurch eine Bilanzierung des Verbleibs von Ag in der Kläranlage möglich ist. Die Proben wurden wie in 4.6.3 beschrieben aufgearbeitet und auf ihren Ag-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen des Ag-Gehaltes sind in Tabelle 27 aufgeführt. Die Messwerte, die in der Kontrolle erzielt wurden lagen alle unterhalb der Nachweisgrenze, das Testsystem war entsprechend frei von Ag. In Anlage 2 wurden Konzentration an  $\text{AgNO}_3$  im Einlauf von 0,812 mg/L an Tag 0 bis 1,148 mg/L an Tag 7 gemessen. Der Gehalt an Ag im Auslauf von Anlage 2 rangierte zwischen 0,002 mg/L an Tag 0 bis 0,0423 mg/L. Silber wurde somit zu fast 100% zu Beginn des Versuchs vom Klärschlamm aufgenommen. Nach einer Woche betrug die Aufnahme von Silber in den Klärschlamm immer noch 96,3%

(Tabelle 27). In diesem Bereich lagen auch die prozentualen Anteile von Ag im Klärschlamm bei der dritten Anlage mit einer Einlaufkonzentration von 2 mg/L. Bei Anlage 4 mit einer Einlaufkonzentration von 4 mg/L zeigte sich ein anderes Bild. Es konnte ein Ag-Gehalt im Einlauf in einem Bereich von 1,893 mg/L (Tag 1) und 3,140 mg/L (Tag 7) gemessen werden. Der Ag-Gehalt im Auslauf stieg im selben Zeitraum allerdings sehr stark von 0,0332 mg/L auf 1,346 mg/L an. Dies führte zu einem prozentualen Anteil an Ag im Klärschlamm von nur 63,8% an Tag 5 bis hin zu 57,1% an Tag 7 (Tabelle 27). Bei einem kontinuierlichen Einlauf verschiedener Ag Konzentrationen in Form von  $\text{AgNO}_3$  über zehn Tage zeigte sich, dass ab einer Konzentration von 4 mg/L nach spätestens fünf Tagen große Mengen an Ag nicht mehr im Klärschlamm sondern im Auslauf der Kläranlage zu finden sind.

Der Ag-Gehalt in den  $\text{AgNO}_3$  Stammlösungen wurde ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 28 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Wiederfindung bei allen angesetzten Stammlösungen zwischen 86% und 98% lagen. Die Stammlösungen waren über einen Zeitraum von drei Tagen stabil.

**Tabelle 27: Ergebnisse der chemischen Analytik von Ein- und Auslaufproben der Kläranlagensimulation mit AgNO<sub>3</sub>**

Versuchstag	Ag-Gehalt des Einlaufs [mg/L]	Ag-Gehalt des Auslaufs [mg/L]	Berechneter Ag-Gehalt im Klärschlamm [mg/L]	Prozentualer Anteil Ag an Klärschlamm [%]
<b>Anlage 1: Kontrolle</b>				
D0	0,0	< NG	< NG	n.b.
D1	0,0003	< NG	< NG	n.b.
D5	0,0	< NG	< NG	n.b.
D7	0,0007	< NG	< NG	n.b.
<b>Anlage 2: 1 mg/L</b>				
D0	0,812	0,002	0,810	99,8
D1	0,869	0,001	0,868	99,9
D5	1,018	0,0214	0,9966	97,9
D7	1,148	0,0423	1,1057	96,3
<b>Anlage 3: 2 mg/L</b>				
D0	1,600	0,0097	1,5903	99,4
D1	1,765	0,0132	1,7518	99,3
D5	1,947	0,0581	1,8889	97,0
D7	1,940	0,0890	1,8510	95,4
<b>Anlage 4: 4 mg/L</b>				
D0	2,025	0,0115	2,0135	99,4
D1	1,893	0,0332	1,8598	98,2
D5	1,986	0,7180	1,2680	63,8
D7	3,140	1,346	1,7940	57,1

NG: Nachweisgrenze; n.b.: nicht bestimmt

**Tabelle 28: Ag-Gehalt der Stammlösung an verschiedenen Zeitpunkten in der Kläranlagensimulation mit AgNO<sub>3</sub>**

Versuchstag	Soll Ag-Gehalt der Stammlösung [mg/L]	Ist Ag-Gehalt der Stammlösung [mg/L]	Wiederfindung [%]
<b>Anlage 2: 1 mg/L</b>			
D0	10	9,6	96
D1	10	9,8	98
D3	10	8,8	88
D5	10	9,6	96
D7	10	9,7	97
<b>Anlage 3: 2 mg/L</b>			
D0	20	19,1	95
D1	20	19,4	97
D3	20	19,1	95
D5	20	19,1	96
D7	20	18,5	93
<b>Anlage 4: 4 mg/L</b>			
D0	40	34,8	86
D1	40	38,4	95
D3	40	39,2	98
D5	40	37,0	92
D7	40	38,2	95

#### Kläranlagensimulation mit NM-300K

In dieser Kläranlagensimulation wurde die Wirkung von NM-300K auf die Mikroorganismen des Klärschlammes untersucht. Auch in diesem Versuch wurde nur die Nitrifikationsstufe simuliert. Die Dosierung der NM-300K Stammsuspension und des synthetischen Abwassers erfolgte hier direkt in das Nitrifikationsbecken. Die Applikation der Stammsuspension und des synthetischen Abwassers erfolgte, wie in Abschnitt 4.4.8 beschrieben, über das Schlauchsystem. Die Stabilität der Stammsuspension von NM-300K war ebenfalls zunächst sichergestellt worden. Die Ergebnisse, die in Abschnitt 5.1.2 dargestellt wurden, belegen die Stabilität bei einer Konzentration von 10 mg/L. Bei dieser Kläranlagensimulation wurden

Konzentrationen im Einlauf von 1 / 4 und 16 mg/L gewählt. Als Kontrolle wurde eine Anlage untersucht, in die lediglich synthetisches Abwasser eingeleitet wurde. Nachdem sich bei dem Versuch mit  $\text{AgNO}_3$  gezeigt hatte, dass die DOC-Konzentrationen im Einlauf zu Beginn des Versuchs zu hoch waren, wurde in diesem Versuch von Beginn an synthetisches Abwasser mit einer um 20% verminderten Konzentration an Pepton, Fleischextrakt und Harnstoff genutzt. Die NM-300K Stammsuspension und das synthetische Abwasser wurden jeweils 10fach konzentriert angesetzt, aus einem Kühlschrank bei 4°C dosiert und nach drei Tagen jeweils gewechselt. Zunächst wurde in die Kläranlagen synthetisches Abwasser, 1:10 verdünnt mit Leitungswasser, über fünf Tage mit einer Durchflussrate von 750 mL/h eingeleitet.

Es hatte sich in dem Versuch mit  $\text{AgNO}_3$  gezeigt, dass die Synchronisation zu einer Verminderung der DOC-Elimination führen kann. Auf eine Synchronisation durch Vereinigung des Klärschlammes der vier Anlagen vor Dosierung von NM-300K wurde daher verzichtet. Nachdem eine DOC-Elimination von  $\geq 80\%$  erreicht wurde, wurde mit der Dosierung der NM-300K Stammsuspension begonnen. Über eine Dauer von 18 Tagen wurde kontinuierlich NM-300K in die Kläranlage dosiert.

Die Messungen des pH-Wertes, des TS-Gehaltes und der Wasserchemie zu den jeweiligen Kläranlagen wurden in Tabelle 59 zusammengefasst. Bei einem TS-Gehalt über 3 g/L wurde jeweils ein Teil des Klärschlammes aus dem Nitrifikationsbecken entnommen, mit dem Ziel einen TS-Gehalt von 2,5 zu erreichen. Der pH-Wert des synthetischen Abwassers wurde bei einem Wert von  $7,5 \pm 0,5$  gehalten, wodurch der pH-Wert des Einlaufs ebenfalls in diesem Bereich lag. Es zeigte sich bei der höchsten Einlaufkonzentration von 16 mg/L an NM-300K, dass es ab Tag 7 zu einer Hemmung des Abbaus von Ammonium zu Nitrit kam.

Die Einzelwerte und die berechnete DOC-Elimination im Verlauf der Kläranlagensimulation wurden in Tabelle 60 (Kläranlage 1; Kontrolle), Tabelle 61 (Kläranlage 2; Einlaufkonzentration: 1 mg/L), Tabelle 62 (Kläranlage 3; Einlaufkonzentration: 4 mg/L) und Tabelle 63 (Kläranlage 4, Einlaufkonzentration: 16 mg/L) wiedergegeben und sind in Kapitel 13.1 (Anhang) zu finden. Eine Übersicht gewonnener Daten stellt Abbildung 6 dar.

Innerhalb der ersten fünf Tage der Vorlaufphase lag die Elimination des DOC in allen Anlagen bei einem Wert von  $\geq 80\%$ , so dass am sechsten Tag die Haupttestphase mit der Dosierung der Stammsuspension beginnen konnte. In der Kontrollanlage ohne Zugabe von NM-300K zeigte sich eine konstante DOC-Elimination durch die Mikroorganismen des Klärschlammes in einem Bereich von 92% bis 97% über die gesamte Versuchsdauer (Tabelle 60). Ein vergleichbares Ergebnis der DOC-Elimination war auch in den Anlagen 2 (Einlaufkonzentration: 1 mg/L) und 3 (Einlaufkonzentration: 4 mg/L) zu beobachten. In Anlage 2 rangierte die DOC-Elimination in einem Bereich von 91% bis 97% (Tabelle 61), in Anlage 3 von 90% bis 97% (Tabelle 62). Ein verändertes Bild zeigte sich in der Anlage mit der höchsten Einlaufkonzentration von 16 mg/L. Die DOC-Elimination nahm mit Beginn der Zugabe von NM-300K zunächst ab. An Tag 0 lag die Elimination noch bei 90%, sank aber im Laufe des Versuchs bis Tag 5 auf 80%. Ab Tag 5 kam es zu einer Regeneration der DOC-Elimination bis auf 94% an Tag 16 (Tabelle 63).

Auch hier zeigte sich bei Betrachtung der Kläranlagen in die NM-300K dosiert wurde, dass nach spätestens drei Tagen eine dunkle Färbung des Klärschlammes festzustellen war, die über die Dauer des Versuchs zu schwarz umschlug.

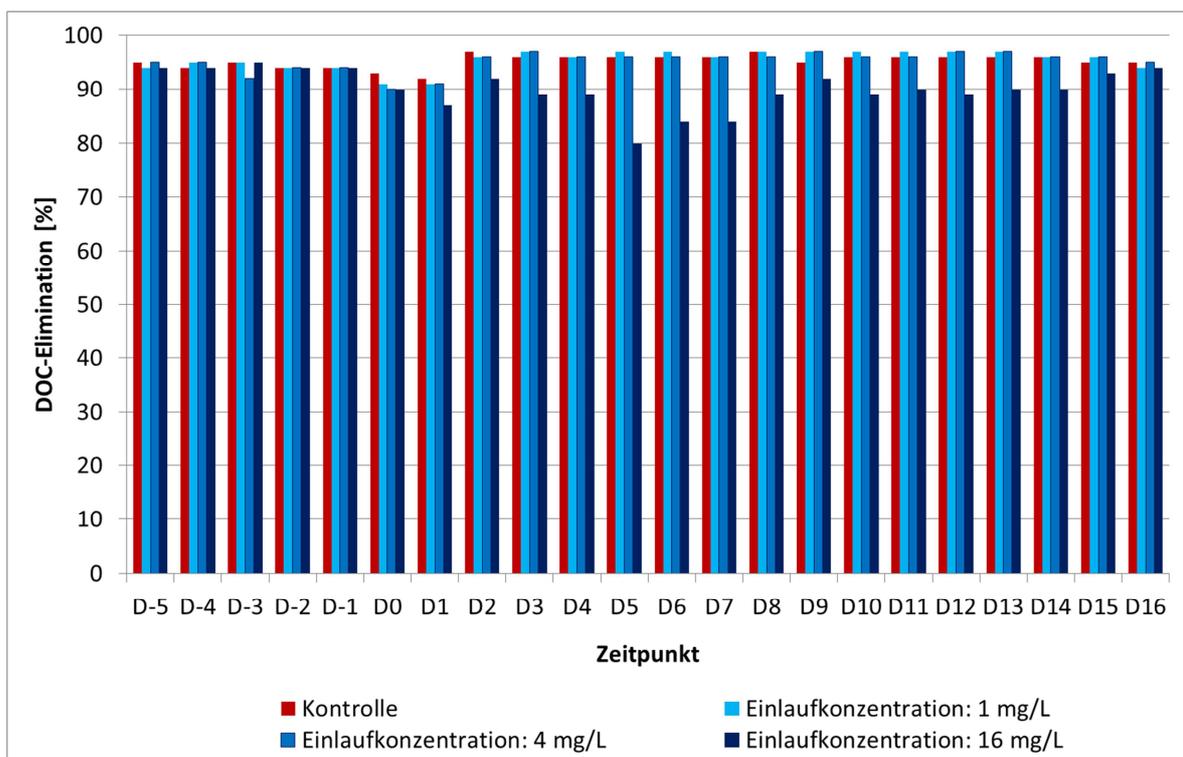


Abbildung 6: Kläranlagensimulation mit NM-300K - DOC-Elimination

### Bilanzierung des Verbleibs von NM-300K in der Kläranlage

Zur Untersuchung des Verbleibs von NM-300K in den Kläranlagen wurden Einlauf- und Auslaufproben jeder Anlage an vier Zeitpunkten auf ihren Ag-Gehalt untersucht. Die untersuchten Zeitpunkte (Tag 1 / 8 und 17) repräsentieren den gesamten Versuchszeitraum, wodurch eine Bilanzierung des Verbleibs von Ag in der Kläranlage möglich ist. Die Proben wurden wie in 4.6.3 beschrieben aufgearbeitet und auf ihren Ag-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen des Ag-Gehaltes sind in Tabelle 29 aufgeführt. Die Messwerte, die in der Kontrolle erzielt wurden, lagen alle unterhalb der Nachweisgrenze, das Testsystem war entsprechend frei von Ag. Für Anlage 2 wurden keine Messungen vorgenommen. Bei einer Konzentration von 1 mg/L im Einlauf wurde zunächst auf Basis der Ergebnisse mit  $\text{AgNO}_3$  angenommen, dass NM-300K nahezu komplett im Klärschlamm vorzufinden ist. Messungen für diese Konzentration wurden aber zu einem späteren Zeitpunkt in einer der Kläranlagensimulationen für die Langzeitversuche nachgeholt.

In Kläranlage 3 ergab sich ein prozentualer Anteil von Ag im Klärschlamm von 68% an Tag 1, 63% an Tag 8 und 84% an Tag 17, womit der Anteil an NM-300K, der im Klärschlamm verblieb, zunahm (Tabelle 29). In der vierten Kläranlage mit einer Einlaufkonzentration von 4 mg/L ergab sich ein prozentualer Anteil an Ag im Klärschlamm von 58,6% zu Beginn des Versuchs (Tag 1), der im Anschluss zunächst auf 38,5% sank, sich dann bis zum Testende wieder auf 63,8% erhöhte (Tabelle 29). Es zeigte sich, dass aufgrund der sehr hohen, kontinuierlich dosierten Konzentrationen an NM-300K über einen Zeitraum von 18 Tagen, die Aufnahmekapazität des Klärschlammes an NM-300K stark beeinflusst wurde.

**Tabelle 29: Ergebnisse der chemischen Analytik von Ein- und Auslaufproben der Kläranlagensimulation mit NM-300K**

Versuchstag	Ag-Gehalt des Einlaufs [mg/L]	Ag-Gehalt des Auslaufs [mg/L]	Berechneter AgGehalt im Klärschlamm [mg/L]	Prozentualer Anteil Ag an Klärschlamm [%]
<b>Anlage 1: Kontrolle</b>				
D1	< NG	< NG	< NG	n.b.
D17	< NG	< NG	< NG	n.b.
<b>Anlage 2: 1 mg/L</b>				
D1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D17	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<b>Anlage 3: 4 mg/L</b>				
D1	2,74	0,878	1,862	68,0
D8	2,60	0,961	1,639	63,0
D17	3,10	0,496	2,604	84,0
<b>Anlage 4: 16 mg/L</b>				
D1	12,6	5,22	7,380	58,6
D8	10,9	6,70	4,200	38,5
D17	11,1	4,02	7,080	63,8

NG: Nachweisgrenze; n.b.: nicht bestimmt

Zusammenfassung der Kläranlagensimulationen

In Tabelle 30 wurden die Ergebnisse zu Wirkung und Verbleib von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> in der Kläranlage für eine bessere Veranschaulichung zusammengefasst.

**Tabelle 30: Erkenntnisse aus den Kläranlagensimulationen mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub>**

Testgegenstand	Einlaufkonzentration [mg/L]	Wirkung auf die Elimination des DOC	Verbleib an Klärschlamm [%]
<b>NM-300K</b>	1	Nein	n.b.
	4	Nein	61,5 – 83,9
	16	Ja (Regeneration über die Zeit)	38,5 – 64,0
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	1	Nein	96,3 – 99,9
	2	Nein	95,4 – 99,4
	4	Ja (Rückgang der DOC-Elimination von 81% auf 52%)	57,1 – 99,4

## 5.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel sind noch einmal alle relevanten Daten zusammengefasst, die für eine Risikocharakterisierung von NM-300K für Böden benötigt werden. In Tabelle 11, Tabelle 14, Tabelle 16 und Tabelle 23 wurden, bei der vorangegangenen Beschreibung der Ergebnisse, die berechneten EC<sub>10</sub>- und NOEC-Werte für die Versuche mit verschiedenen primär und sekundär Destruenten (Mikroorganismen, Kompostwurm) und Produzenten (Pflanzen) angegeben. Tabelle 26 (Atmungshemmtest) und Tabelle 30 (Kläranlagensimulation) geben zusätzlich einen kurzen Überblick über Effekte, hervorgerufen durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub>, auf die Mikroorganismenaktivität im Klärschlamm und zeigen, wo und in welchen prozentualen Anteilen Ag in Form von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> in der Kläranlage verbleibt. EC<sub>10</sub> und NOEC-Werte konnten bei den Kläranlagensimulationen aufgrund fehlender Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen und einer zu geringen Anzahl an Konzentrationen nicht berechnet werden. Für den Regenwurm Fluchttest wurden diese Werte ebenfalls nicht berechnet, da dieser Versuch durchgeführt wurde, um einschätzen zu können, wie *Eisenia andrei* auf die Zugabe von NM-300K oder AgNO<sub>3</sub> in Boden reagiert und ab welchem Bodengehalt die Tiere Silber detektieren können. Dieser Versuch sollte

Informationen für den Regenwurm Reproduktionstest, und für weitere Versuche mit dem Fluchttest in den Langzeitversuchen des realistischen Nutzungsszenarios liefern.

In dem manometrischen Respirationstest zeigte sich, dass der Dispersant von NM-300K über eine Versuchsdauer von 28 Tagen zu 91,9% abgebaut wurde. Aus diesem Resultat kann darauf geschlossen werden, dass der Dispersant auch im Boden abgebaut wird.

Die stärkste toxische Wirkung übte NM-300K auf die Gruppe der Destruenten aus. Die Bodenmikroflora, speziell die autothrophen Nitrifikanten wurden über den gesamten Testverlauf stark in der Bildung von Nitrat gehemmt. Es wurde beobachtet, dass die Hemmung, verursacht durch NM-300K, mit fortschreitender Dauer des Versuchs stärker wurde. Nach 28 Tagen ergab sich in diesem Versuch eine  $EC_{10}$  von 0,5 mg/kg TM Boden und eine NOEC von < 0,56 mg/kg TM Boden (Tabelle 14). Bei  $AgNO_3$  zeigte sich, dass über den gleichen Zeitraum eine konstante Hemmung der Nitratbildung zu beobachten war. Die  $EC_{10}$  lag für  $AgNO_3$  mit 1,4 mg/kg TM Boden auf einem Niveau mit dem von NM-300K. Der NOEC-Wert für  $AgNO_3$  wurde mit 0,56 mg/kg TM Boden berechnet (Tabelle 14).

Auch in dem Versuch der C-Transformation nach OECD Richtlinie 217 wurde eine starke hemmende Wirkung auf mikrobielle Biomasse durch NM-300K festgestellt. Hier wurde eine  $EC_{10}$  von 1,0 mg/kg TM Boden und eine NOEC von 1,67 mg/kg TM Boden nach 28 Tagen berechnet (Tabelle 11). Der Versuch zeigte, dass die Hemmung der mikrobiellen Biomasse über die Testdauer permanent zunahm. Für  $AgNO_3$  ergab sich ein anderes Bild. Hier wurde die stärkste Hemmung mit einer  $EC_{50}$  von 1,1 mg/kg TM Boden und einer NOEC von < 0,19 mg/kg TM Boden an Tag 0 ermittelt (Tabelle 11). Eine  $EC_{10}$  konnte an Tag 0 aufgrund der starken Hemmung ab dem niedrigsten Bodengehalt nicht ermittelt werden. Die Hemmung der mikrobiellen Biomasse nahm von Tag 0 bis Tag 28 stetig ab. Nach 28 Tagen zeigten sich bei den niedrigeren Bodengehalten Stimulationen der mikrobiellen Biomasse. Diese Stimulation nahm mit steigendem Bodengehalt an  $AgNO_3$  ab. Im höchsten Bodengehalt ergaben sich Werte für die mikrobielle Biomasse auf Kontrollniveau. Entsprechend war es nicht möglich eine  $EC_{10}$  und NOEC-Werte für  $AgNO_3$  nach 28 Tagen zu ermitteln.

Die stärkste Wirkung zeigte NM-300K auf die Mikroorganismen im Boden, war jedoch weniger toxisch auf die Mikroorganismen des Klärschlammes. Die anhand der Ergebnisse des Atmungshemmtests berechnete  $EC_{10}$  lag hier bei 27,9 und 32,2 mg/L, die NOEC bei  $\leq 9,0$  mg/L (Tabelle 26). In diesem Testsystem wurde die Respirationsrate durch  $AgNO_3$  stark gehemmt. Die  $EC_{10}$  wurde für  $AgNO_3$  in zwei Versuchen mit einer Konzentration von 1,1 bzw. 1,3 mg/L berechnet (Tabelle 26).

Bei einem weiteren Organismus der Gruppe der Destruenten, dem Kompostwurm *Eisenia andrei*, zeigten sich im Reproduktionstest ebenfalls starke, durch NM-300K verursachte, Wirkungen. Während es zu keiner Mortalität bei adulten Würmern kam und die Entwicklung der Biomasse stimuliert wurde, ergaben sich starke Hemmungen auf die Reproduktionsfähigkeit der Würmer. Werte für die  $EC_{10}$  konnten nicht berechnet werden, entsprechend wurden die  $EC_{20}$  und die NOEC betrachtet. In dem Versuch mit NM-300K ergab sich hierbei eine  $EC_{20}$  von 10,7 mg/kg TM Boden bei Vergleich mit der Kontrolle und von 44,8 mg/kg TM Boden bei dem Vergleich mit der Kontrolle, der den Dispersant enthielt (Tabelle 16). Beide Werte wurden hier berechnet, da nur in diesem Versuch der Dispersant eine hemmende Wirkung auf die Reproduktion der Würmer ausgeübt hatte. Eine NOEC von  $< 15$  mg/kg TM Boden wurde in beiden Fällen berechnet (Tabelle 16). Auch in den Versuchen mit  $AgNO_3$  kam es zu keiner signifikanten Mortalitätsrate und es wurden keine Effekte auf Entwicklung der Biomasse festgestellt. Die Reproduktion der Würmer war auch in diesen Versuchen der sensitivste Endpunkt. In zwei Versuchen mit  $AgNO_3$  wurden für die Reproduktion  $EC_{20}$ -Werte von 10,9 und 11,4 mg/kg TM Boden ermittelt. Die NOEC lag in beiden Versuchen bei einem Bodengehalt von  $< 15$  mg/kg TM Boden (Tabelle 16).

In dem Regenwurm Fluchttest mit *Eisenia andrei* und NM-300K wurde festgestellt, dass schon bei einem Bodengehalt von 1,2 mg/kg TM Boden mehr Tiere in dem Segment mit nicht kontaminiertem Boden zu finden waren. Ab einem Gehalt von 3,7 mg/kg TM Boden wurde ein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet. In dem Versuch mit  $AgNO_3$  war ab einem Bodengehalt von 6,25 mg/kg TM Boden ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelbar.

Die Wirkung von NM-300K auf die Produzenten wurde mit dem Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208 untersucht. Die Versuche wurden jeweils mit *Phaseolus aureus* L. (Bohne) und *Avena sativa* L. (Hafer) durchgeführt. Es zeigten sich bei

beiden Pflanzen weder Chlorosen noch Nekrosen über den gesamten Testverlauf und nur die Entwicklung der Biomasse bzw. des Frischgewichtes wurde signifikant beeinträchtigt.

Die Wirkung von NM-300K auf *Avena sativa* L. und *Phaseolus aureus* L. war dabei vergleichbar. Es wurden gemäß der Richtlinie die  $EC_{25}$  mit einem Wert von 32,1 mg/kg TM Boden für *Avena sativa* L. und mit 20,1 und 33,5 mg/kg TM Boden für *Phaseolus aureus* L. berechnet. Die NOEC lag für beide Pflanzen bei 10 mg/kg TM Boden bzw. für *Phaseolus aureus* L. im Validierungsversuch bei 13,5 mg/kg TM Boden (Tabelle 23). Aus den Versuchen mit  $AgNO_3$  konnten die Biomasseentwicklung Werte für die  $EC_{25}$  von 16,1 und 43,2 mg/kg TM Boden bei *Phaseolus aureus* und 10,9 mg/kg TM Boden für *Avena sativa* L. berechnet werden. Die NOEC in dem Versuch mit *Phaseolus aureus* L. lag bei einem Bodengehalt von 1,0 mg/kg TM Boden, für *Avena sativa* L. bei  $< 0,1$  mg/kg TM Boden (Tabelle 23).

In den Kläranlagensimulationen zeigte sich, dass eine sehr hohe Konzentrationen von 16 mg/L NM-300K im Einlauf erforderlich war, bis die NM-300K eine Wirkung auf die Mikroorganismen des Klärschlammes ausübte. Innerhalb der ersten fünf Tage sank die DOC-Elimination in der höchsten Konzentration zwar bis auf 80% ab, im Anschluss kam es aber zu einer Regeneration der Elimination, so dass keine statistisch signifikanten Unterschiede aufgezeigt wurden. Für den Verbleib von Ag am Klärschlamm konnten Werte von 38,5 – 64% berechnet werden. Allerdings bedeutet eine nominale Einlaufkonzentration von 16 mg/L, die kontinuierlich mit 750 mL/h und einem TS-Gehalt von ca. 3 g/L in die Anlage dosiert wird, einen theoretischen Ag-Gehalt im Klärschlamm von 5333 mg/kg TS Klärschlamm schon zu Beginn des Versuchs. In der „worst case“ Einlaufkonzentration von 1 mg/L ergeben sich Werte, unter gleichen Annahmen wie zuvor, von 333 mg/kg TS Klärschlamm bzw. von 60000 mg/kg TS Klärschlamm über 10 Tage.

In der Kläranlagensimulation mit  $AgNO_3$  zeigte sich, dass auch bei der höchsten Konzentration von 4 mg/L NM-300K im Einlauf, die Abbauleistung der Mikroorganismen des Klärschlammes stark gehemmt wurde. Über die gesamte Versuchsdauer sank die DOC-Elimination in der höchsten Konzentration bis auf 52% ab, es kam im Anschluss nicht zu einer Regeneration der Elimination wie bei NM-300K. In den beiden niedrigeren Konzentrationen wurde berechnet, dass zwischen 95% und 100% an Ag im Klärschlamm verbleiben. Für den Verbleib von Ag im

Klärschlamm konnten bei der höchsten Konzentration Werte von 99,4% zu Beginn und 57,1% bei Versuchsende berechnet werden. Hier bedeutet eine nominale Einlaufkonzentration von 4 mg/L, die kontinuierlich mit 750 mL/h und einem TS-Gehalt von ca. 3 g/L in die Anlage dosiert wird, einen theoretischen Ag-Gehalt im Klärschlamm von 1333 mg/kg TS Klärschlamm schon zu Beginn des Versuchs. In der „worst case“ Einlaufkonzentration von 1 mg/L ergeben sich Werte, unter denselben Annahmen wie zuvor, von 333 mg/kg TS Klärschlamm bzw. von 60000 mg/kg TS Klärschlamm über 10 Tage.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass NM-300K im Boden auf Einzeller (Mikroorganismen) ein wenig stärker wirkt als AgNO<sub>3</sub>. Bei mehrzelligen Organismen wie dem Regenwurm und den Pflanzen wirkt AgNO<sub>3</sub> etwas stärker als NM-300K. In der wässrigen Matrix des Atmungshemmtests und der Kläranlagensimulation hingegen zeigte sich, dass die Wirkung hervorgerufen durch AgNO<sub>3</sub> wesentlich stärker war, als die von NM-300K.

## 6 Auswirkung von Abwasserkomponenten auf die Wirkung von NM-300K

Ziel dieser Versuchsreihe war es herauszufinden, welche Abwasserkomponenten in einer Kläranlage die Wirkung von NM-300K beeinflussen. Abwasser besteht aus den verschiedensten Salzkonzentrationen, in Waschmitteln sind oft Komplexbildner enthalten und auch zu pH-Wert Schwankungen kann es durch verschiedene äußere Einflüsse kommen. All diese komplexen Szenarien sollten hier betrachtet werden. Aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Wirkung von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  im Atmungshemmtest war bekannt, dass die  $\text{EC}_{50}$ -Wert von NM-300K bei einer Konzentration von 50 mg/L und für  $\text{AgNO}_3$  von 2 mg/L liegt. In den folgenden Versuchen wurden nur diese beiden Konzentrationen untersucht, um die vielfältigen Möglichkeit der verschiedenen Veränderungen des Umgebungsmediums zu untersuchen. Um einen Effekt durch die vorgenommene Modifikation auszuschließen, wurden Kontrollen mit der jeweiligen Modifikation zusätzlich untersucht. Diese zusätzlichen Kontrollen wurden auch zu Beginn und Ende jedes Versuchs betrachtet.

### 6.1 Modifikation des synthetischen Abwasser

Ziel dieses Versuches war es zu untersuchen, ob eine Modifikation des synthetischen Abwassers (hergestellt nach OECD Richtlinie 209) eine veränderte Wirkung von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  im Atmungshemmtest hervorruft. Das synthetische Abwasser wurde 1/2fach konzentriert und 10fach konzentriert angesetzt. Als Kontrolle diente in diesem Versuch das nach OECD Richtlinie 209 (1984) angesetzte synthetische Abwasser. In den Versuchen wurden jeweils 16 mL des synthetischen Abwassers in den verschiedenen Konzentrationen vor Zugabe von NM-300K oder  $\text{AgNO}_3$  in das Testsystem gegeben. Im Anschluss erfolgte, zehn Minuten vor der Zugabe des Inokulums, die Zugabe von NM-300K oder  $\text{AgNO}_3$ . Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Die Validitätskriterien wurden erfüllt, die Abweichung beider Kontrollen lag unter 7,5%, die Abweichung zwischen  $K_{\min}$  und  $K_{\max}$  war kleiner als 20%. Zu Versuchsbeginn und am Versuchsende zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle, der Kontrolle mit 1/2fachem und der Kontrolle mit 10fach konzentriertem synthetischem Abwasser.

**Tabelle 31: Veränderung der Toxizität von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> durch die Modifikation des synthetischen Abwassers**

Testgegenstand	Konzentration [mg/L]	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> /(L*h)]	Hemmung der Respiration [%]
<b>Kontrollen</b>	Kontrolle (Standard Medium)	14,6	-
	Kontrolle (1/2fach Medium)	14,9	2,2
	Kontrolle (10fach Medium)	14,7	3,4
<b>NM-300K</b>	50 (Standard Medium)	6,1	60,1
	50 (1/2fach Medium)	4,3	71,9
	50 (10fach Medium)	15,8	-3,4
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	2 (Standard Medium)	9,0	41,0
	2 (1/2fach Medium)	5,1	66,9*
	2 (10fach Medium)	15,9	-3,9
<b>Kontrollen</b>	Kontrolle (1/2fach Medium)	17,1	-11,8
	Kontrolle (10fach Medium)	8,9	41,6
	Kontrolle (Standard Medium)	15,9	-8,9

Für NM-300K zeigte sich, dass es bei einer Konzentration von 50 mg/L zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Respirationsrate von 60,1% kam. Bei einer Verminderung der Konzentration des synthetischen Abwassers stieg auch die Hemmung von NM-300K leicht auf 71,9% an (Tabelle 31). Sobald das synthetische Abwasser höher konzentriert (10fach) in den Versuch gegeben wurde, konnte keine Hemmung der Respirationsrate mehr festgestellt werden. Dieser Verlauf wird durch die Ergebnisse, die in dem Versuch mit AgNO<sub>3</sub> erzielt wurden, bestätigt. Auch hier stieg die Hemmung der Respirationsrate mit nur 1/2fach konzentriertem synthetischem Abwasser von 41,0% auf 66,9%, während bei 10fach konzentriertem Abwasser keine Hemmung mehr vorhanden war (Tabelle 31).

## 6.2 Modifikation des pH-Wertes

### 6.2.1 Modifikation des pH-Wertes vor Klärschlammzugabe

Ziel war zu untersuchen, ob eine Modifikation des pH-Wertes im Testsystem, vor Zugabe des Klärschlammes, eine Änderung der Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Atmungshemmtest hervorruft. Nach Zugabe des destillierten Wassers, des

synthetischen Abwassers und der Testsubstanz wurde der pH-Wert jeweils auf pH 6 / 7 und 8 eingestellt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 32 dargestellt.

**Tabelle 32: Veränderung der Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> bei einer Modifikation des pH-Wertes**

Testgegenstand	Konzentration [mg/L]	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> /(L*h)]	Hemmung der Respiration [%]
Kontrollen	Kontrolle pH 7	17,2	-
	Kontrolle pH 6	17,1	3,7
	Kontrolle pH 8	15,4	13,4
NM-300K	50 (pH 7)	10,6	40,1
	50 (pH 6)	11,8	33,7
	50 (pH 8)	10,9	38,5
AgNO <sub>3</sub>	2 (pH 7)	11,1	37,4
	2 (pH 6)	12,3	30,5
	2 (pH 8)	14,2	19,8
Kontrollen	Kontrolle (pH 6)	15,3	13,9
	Kontrolle (pH 8)	15,6	11,8
	Kontrolle (pH 7)	18,3	-6,4

Die Validitätskriterien wurden erfüllt, die Abweichung beider Kontrollen lag unter 7,5%, die Abweichung zwischen  $K_{\min}$  und  $K_{\max}$  war kleiner als 20%. Anhand der Kontrollen mit einem veränderten pH-Wert wurde ersichtlich, dass eine Erhöhung oder Verminderung des pH-Wertes keine Wirkung auf die Respirationsrate der Mikroorganismen im Klärschlamm hatte.

Es zeigte sich für NM-300K, dass es bei einer Konzentration von 50 mg/L zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Respirationsrate von 40,1% kam. Bei einer Verminderung des pH-Wertes auf 6 wurde die Hemmung der Respiration vermindert (33,7%), bei einer Erhöhung des pH-Wertes auf pH 8 änderte sich die durch NM-300K hervorgerufene Hemmung der Respirationsrate nicht. Bei AgNO<sub>3</sub> wurde die Hemmung der Respirationsrate bei pH 6 von 37,4% (pH 7) auf 30,5% reduziert. Bei einem pH-Wert von 8 verminderte sich die Hemmung auf 19,8% (Tabelle 32). Nach Beendigung des Versuchs wurde der pH-Wert in den einzelnen Replikaten

nachgemessen und es zeigte sich, dass der pH-Wert nach Zugabe des Inokulums nicht stabil geblieben war. Es zeigte sich in den verschiedenen Gefäßen, dass sich der pH-Wert auf einen Wert zwischen 7,0 und 7,5 änderte.

### 6.2.2 Modifikation des pH-Wertes nach Klärschlammzugabe

Nachdem sich bei dem ersten Versuch mit pH-Wert Veränderungen (6.2.1) herausgestellt hatte, dass der pH-Wert nach Zugabe des Inokulums nicht stabil geblieben war, wurde in diesem Versuch der pH-Wert nach der Zugabe des Klärschlammes auf pH 6 / 7 und 8 eingestellt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 33 aufgeführt.

**Tabelle 33: Veränderung der Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> bei einer Modifikation des pH-Wertes**

Testgegenstand	Konzentration [mg/L]	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> / (L*h)]	Hemmung der Respiration [%]	pH – Wert bei Teststart	pH – Wert nach 3 Stunden
<b>Kontrollen</b>	Kontrolle pH 7	13,3	-	7,01	7,48
	Kontrolle pH 6	14,2	-0,6	6,00	7,16
	Kontrolle pH 8	14,1	0,6	8,00	7,80
<b>NM-300K</b>	50 (pH 7)	6,6	53,3	7,01	7,39
	50 (pH 6)	6,7	52,7	5,99	7,04
	50 (pH 8)	8,0	43,6	7,99	7,78
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	2 (pH 7)	7,4	47,9	7,01	7,42
	2 (pH 6)	6,6	53,3	6,00	7,00
	2 (pH 8)	8,7	38,8	7,99	7,80
<b>Kontrollen</b>	Kontrolle (pH 6)	14,2	-0,6	6,00	7,30
	Kontrolle (pH 8)	13,6	3,6	7,99	7,90
	Kontrolle (pH 7)	14,0	-5,3	7,00	7,55

Die Validitätskriterien wurden erfüllt, die Abweichung beider Kontrollen lag unter 7,5%, die Abweichung zwischen  $K_{\min}$  und  $K_{\max}$  war kleiner als 20%. Es zeigte sich auch in diesem Versuch, dass sich der pH-Wert innerhalb von drei Stunden Inkubationszeit stark änderte. Die Replikate in denen ein pH von 6 eingestellt worden war, hatten nach drei Stunden einen pH-Wert zwischen 7,00 und 7,30. Bei einem

eingestellten pH von 7 lag der Wert nach drei Stunden zwischen 7,39 und 7,55. Nur bei einem pH-Wert von 8 zeigten sich geringere Schwankungen mit pH-Werten von 7,78 bis 7,90 (Tabelle 33).

Anhand der Kontrollen wurde ersichtlich, dass eine Erhöhung oder Verminderung des pH-Wertes keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Respiration der Mikroorganismen im Klärschlamm hatte.

Für NM-300K wurde festgestellt, dass es bei einer Konzentration von 50 mg/L und einem pH von 7 zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Respirationsrate von 53,3% kam (Tabelle 33). Bei einem pH Wert von 6 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu der Hemmung bei einem pH-Wert von 7. Auch eine Erhöhung des pH-Wertes auf pH 8 ergab keine signifikanten Unterschiede, wobei eine Verminderung der Hemmung der Respiration von 53,3% auf 43,6% festgestellt wurde (Tabelle 33). Auch bei einer Konzentration von 2 mg/L AgNO<sub>3</sub> zeigte sich keine signifikante Änderung der Hemmung der Respirationsrate bei pH 6 und pH 8 im Vergleich zu pH 7.

### **6.3 Zugabe eines Komplexbildner**

#### **6.3.1 Komplexbildner (Natriumhexametaphosphat)**

Ziel dieses Versuches war es zu untersuchen, ob eine Reaktion von NM-300K / AgNO<sub>3</sub> mit einem Komplexbildner, hier Natriumhexametaphosphat (kurz: Calgon), eine Änderung der Wirkung im Atmungshemmtest hervorruft. Nach der Zugabe von destilliertem Wasser wurden jeweils Konzentrationen von 1 / 50 und 100 mg/L Calgon hinzugefügt. Im Anschluss wurden das synthetische Abwasser, die Testsubstanz und das Inokulum hinzugegeben. Um einen Effekt durch die Modifikation des Abwassers auszuschließen, wurden jeweils am Anfang und am Ende des Versuchs Kontrollen mit der höchsten Konzentration (100 mg/L) an Komplexbildner untersucht. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 34 dargestellt.

**Tabelle 34: Veränderung der Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> bei Zugabe eines Komplexbildners (Calgon)**

Testgegenstand	Konzentration [mg/L]	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> / (L * h)]	Hemmung der Respiration [%]
<b>Kontrollen</b>	Kontrolle	15,0	-
	Kontrolle (100 mg Calgon/L)	15,8	2,7
<b>NM-300K</b>	50 (1 mg Calgon/L)	8,9	45,1
	50 (50 mg Calgon/L)	9,3	42,5
	50 (100 mg Calgon/L)	8,9	45,1
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	2 (1 mg Calgon/L)	11,2	30,9
	2 (50 mg Calgon/L)	10,3	36,7
	2 (100 mg Calgon/L)	11,3	30,3
<b>Kontrollen</b>	Kontrolle (100 mg Calgon/L)	16,5	-1,8
	Kontrolle	16,2	-8,0

Die Validitätskriterien wurden erfüllt, die Abweichung beider Kontrollen lag unter 7,5%, die Abweichung zwischen  $K_{\min}$  und  $K_{\max}$  war kleiner als 20%. Anhand der Kontrollen mit Calgon zeigte sich, dass eine Zugabe von Calgon keine signifikante Wirkung auf die Respiration der Mikroorganismen im Klärschlamm hatte. Die von NM-300K hervorgerufene Hemmung wurde nicht durch die Zugabe von Calgon beeinflusst. Bei den drei zugegebenen Konzentrationen an Calgon befand sich die Hemmung, verursacht durch 50 mg/L NM-300K, in einem Bereich von 42,5 bis 45,1% (Tabelle 34). Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei AgNO<sub>3</sub>. Hier rangierte die Hemmung zwischen 30,4 und 36,7% und wurde nicht durch die Zugabe von Calgon beeinflusst (Tabelle 34).

### 6.3.2 Komplexbildner (Nitrilotriessigsäure; kurz NTA)

Hier wurde untersucht, ob eine Zugabe des Komplexbildners NTA in das Testsystem die Wirkung von NM-300K / AgNO<sub>3</sub> verändert. Nach Zugabe von destilliertem Wasser wurden jeweils Konzentrationen von 1 / 50 und 100 mg/L NTA in das Testgefäß gegeben. Im Anschluss wurden das synthetische Abwasser, die Testsubstanz und das Inokulum hinzugegeben. Um einen Effekt durch die Modifikation des Abwassers auszuschließen, wurden jeweils am Anfang und am

Ende des Versuchs Kontrollen mit der höchsten Konzentration (100 mg/L) an Komplexbildner untersucht. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 35 aufgeführt.

**Tabelle 35: Veränderung der Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> bei Zugabe eines Komplexbildners (NTA)**

Testgegenstand	Konzentration [mg/L]	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> / (L*h)]	Hemmung der Respiration [%]
<b>Kontrollen</b>	Kontrolle	21,3	
	Kontrolle (100 mg NTA/L)	21,3	0
<b>NM-300K</b>	50 (1 mg NTA/L)	11,7	45,3
	50 (50 mg NTA/L)	12,5	41,2
	50 (100 mg NTA/L)	10,6	50,1
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	2 (1 mg NTA/L)	16,8	21,1
	2 (50 mg NTA/L)	15,3	28,0
	2 (100 mg NTA/L)	20,5	3,7
<b>Kontrollen</b>	Kontrolle (100 mg NTA/L)	20,8	2,3
	Kontrolle	19,5	8,4

Die Validitätskriterien wurden erfüllt, die Abweichung beider Kontrollen lag unter 7,5%, die Abweichung zwischen  $K_{\min}$  und  $K_{\max}$  war kleiner als 20%. Anhand der Kontrollen wurde ersichtlich, dass eine Zugabe von NTA keine signifikanten Effekte auf die Respiration der Mikroorganismen im Klärschlamm hatte. Die von NM-300K hervorgerufene Hemmung der Respiration wurde nicht durch die Zugabe von NTA beeinflusst. Bei den drei zugegebenen Konzentrationen an Calgon befand sich die Hemmung, verursacht durch eine Konzentration von 50 mg/L NM-300K, in einem Bereich von 41,2 bis 50,1% (Tabelle 35). Die Wirkung von AgNO<sub>3</sub> wurde hingegen beeinflusst. Bei einer Zugabe an NTA von 1 und 50 mg/L konnten Hemmungen in einem Bereich von 21,1 und 28,0% festgestellt werden. Bei der höchsten Konzentration an NTA von 100 mg/L wurde die Respiration nur noch um 3,7% gehemmt (Tabelle 35). Die Zugabe von NTA als Komplexbildner hatte somit keinen Einfluss auf die Wirkung von NM-300K, allerdings zeigte sich bei der höchsten zugegebenen Konzentration an NTA von 100 mg/L eine verminderte Hemmung durch AgNO<sub>3</sub>.

## 6.4 Wirkung von AgNP-haltigem Fasermaterial

### 6.4.1 Indirekter Kontakt mit Fasern

Im Rahmen des Projektes „Umsicht“ (Bundesministerium für Bildung und Forschung 2010 - 2013) sollten Waschprozesse mit verschiedenem Fasermaterial, welches sowohl mit verschiedenen AgNP als auch AgNO<sub>3</sub> beladen war, untersucht werden. Hierzu wurden mit den beladenen Fasern Versuche im Atmungshemmtest zur Wirkung auf die Mikroorganismen durchgeführt. In Tabelle 1 ist eine Zusammenstellung der verschiedenen Fasertypen und der entsprechenden Konzentrationen gegeben. In diesem ersten Versuch mit Fasern wurden je 1 g der zu untersuchenden Fasern in der zur Verfügung stehenden Menge an destilliertem Wasser (283 mL) über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 500 rpm gerührt. Im Anschluss wurden die Fasern per Sieb aus dem Testgefäß entnommen. Das synthetische Abwasser, die Testsubstanz und das Inokulum wurden hinzugegeben. Um einen Effekt durch eventuelle Faserrückstände im destillierten Wasser auszuschließen, wurden Kontrollen zu Anfang und Ende des Versuchs mit AgNP-freien Fasern durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind der Tabelle 36 zu entnehmen.

**Tabelle 36: Wirkung von mit AgNP beladenen Fasern im Atmungshemmtest**

Konzentration [mg/L]	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> / (L*h)]	Hemmung der Respiration [%]
Kontrolle	26,2	-
Kontrolle (Fasern)	28,7	-9,4
<b>0,5 (V1946; NM-300K)</b>	27,3	-3,8
<b>1,0 (V1947; NM-300K)</b>	28,5	-8,6
<b>1,52 (OMPG 1; Biogate Ag-NP)</b>	27,7	-5,5
<b>40 (OMPG 2; NM-300K)</b>	26,8	-2,1
<b>130 (Smartfiber; AgNO<sub>3</sub>)</b>	27,1	-3,3
Kontrolle (Fasern)	26,0	1,0
Kontrolle	26,4	-6,9

Die Validitätskriterien wurden erfüllt, die Abweichung beider Kontrollen lag unter 7,5%, die Abweichung zwischen K<sub>min</sub> und K<sub>max</sub> war kleiner als 20%. Die Kontrolle mit

AgNP-freien Fasern zeigte keine Hemmung der Respiration. In keinem der Replikaten, in denen über 24 Stunden AgNP- und AgNO<sub>3</sub>-haltige Fasern gerührt wurden ergab sich eine Hemmung der Respiration im Vergleich zur Kontrolle, die statistisch signifikant war.

#### 6.4.2 Direkter Kontakt mit Fasern

Nachdem sich in dem ersten Versuch mit Fasermaterial keine Wirkung gezeigt hatte, wurde ein zweiter Versuch durchgeführt. In diesem Versuch wurde je 1 g der Fasern mit einer Gaze ummantelt, um ein zu starkes Aufsaugen des Klärschlammes durch die Fasern zu vermeiden. Die Fasern wurden nicht wie in dem ersten Versuch aus dem Testgefäß entnommen. Das synthetische Abwasser, die Testsubstanz und das Inokulum wurden in das Testsystem gegeben. Um einen Effekt durch die Präsenz der Fasern auszuschließen, wurden Kontrollen zu Anfang und Ende des Versuchs mit AgNP-freien Fasern durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesem Versuch sind in Tabelle 37 dargestellt. Die Validitätskriterien wurden erfüllt, die Abweichung beider Kontrollen lag unter 7,5%, die Abweichung zwischen K<sub>min</sub> und K<sub>max</sub> war kleiner als 20%. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Respirationsrate bei dem Vergleich der Kontrolle mit den Kontrollen, die Ag-freie Fasern enthielten.

**Tabelle 37: Wirkung von mit AgNP beladenen Fasern im Atmungshemmtest**

Konzentration [mg/L]	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> / (L*h)]	Hemmung der Respiration [%]
Kontrolle	20,6	-
Kontrolle (Fasern)	19,3	4,6
<b>0,5 (V1946; NM-300K)</b>	17,1	15,8
<b>1,0 (V1947; NM-300K)</b>	15,0	26,1
<b>1,52 (OMPG 1; Biogate Ag-NP)</b>	20,6	-1,4
<b>40 (OMPG 2; NM-300K)</b>	15,0	25,9
<b>130 (Smartfiber; AgNO<sub>3</sub>)</b>	1,9	90,5
Kontrolle (Fasern)	19,3	4,6
Kontrolle	20,2	1,9

Im Gegensatz zu dem ersten Versuch mit AgNP-haltigen Fasern wurden in diesem Versuch starke Effekte, verursacht durch die AgNP, festgestellt. V1946 und V1947,

mit Konzentrationen an NM-300K von 0,5 bzw. 1,0 mg/L, zeigten eine hemmende Wirkung auf die Respiration der Mikroorganismen von 15,8 und 26,1%. Auch durch die OMPG 2 Fasern wurde die Respirationsrate der Mikroorganismen vermindert, bei einer Konzentration von 40 mg/L allerdings nur um 25,9% (Tabelle 37). Fasern, die mit dem Biogate AgNP mit einer Größe zwischen 80 und 140 nm beladen waren, hatten keinen Einfluss auf die Respiration der Mikroorganismen. Fasern auf die AgNO<sub>3</sub> aufgetragen wurde, verursachten eine Hemmung der Respiration von 90,5% bei einer Konzentration von ca. 130 mg/L (Tabelle 37).

### 6.5 Zugabe von Waschwasser

Es wurde untersucht, ob eine Reaktion von NM-300K bzw. AgNO<sub>3</sub> mit den Komponenten des Waschwassers eine Änderung der Wirkung im Atmungshemmtest hervorruft. Das Waschwasser wurde in einer Waschflotte nach DIN EN ISO 15797 (2004) an den Hohenstein Instituten hergestellt. Der Waschflotte wurden das Referenzwaschmittel Annex ohne optische Aufheller und ein Standardkomplexbildner zugesetzt. Die Waschtemperatur betrug 75°C und es wurde weiße Berufskleidung nach DIN EN ISO 15797 (2004) gewaschen. Das Waschwasser hatte einen pH Wert von 11 und es konnte nur ein relativ geringes Volumen (10 mL) dem Testsystem zugesetzt werden, um eine Veränderung des pH-Wertes zu vermeiden. Zu Beginn des Versuches wurden 10 mL des Waschwassers in das destillierte Wasser gegeben. Im Anschluss wurden das synthetische Abwasser, die Testsubstanz und der Klärschlamm hinzugegeben. Um einen Effekt durch die Modifikation des Abwassers auszuschließen, wurden jeweils am Anfang und am Ende des Versuches Kontrollen mit dem Waschwasser und ohne Zusatz von Testsubstanz untersucht. Der Versuch wurde nur mit NM-300K und der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol durchgeführt. Es wurden Konzentrationen an NM-300K von 25 / 50 und 100 mg/L untersucht.

Die Validitätskriterien wurden erfüllt, die Abweichung beider Kontrollen lag unter 7,5%, die Abweichung zwischen  $K_{\min}$  und  $K_{\max}$  war kleiner als 20%. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Respirationsrate bei dem Vergleich der Kontrolle mit der Kontrolle, die Waschwasser enthielt. In den Replikaten mit NM-300K wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ermittelt. Die Hemmung der Respiration durch NM-300K stieg von 25,7% (25,0 mg/L) auf 93,8% bei (100 mg/L) (Tabelle 38).

Diese Werte sind vergleichbar mit den Hemmungen, die bei identischen Konzentrationen in Kapitel 5.7 ermittelt wurden.

**Tabelle 38: Ergebnisse zur veränderten Wirkung von NM-300K bei Zugabe von Waschwasser im Atmungshemmtest**

Testgegenstand	Konzentration [mg/L]	Respirationsrate [mg O <sub>2</sub> / (L*h)]	Hemmung der Respiration [%]
<b>Kontrollen</b>	Kontrolle	14,5	-
	Kontrolle (10 mL Waschwasser/L)	14,8	-8,8
<b>NM-300K</b>	25 (10 mL Waschwasser/L)	10,1	25,7
	50 (10 mL Waschwasser/L)	2,0	85,0
	100 (10 mL Waschwasser/L)	0,8	93,8
<b>Referenz 3,5-Dichlorphenol</b>	12	11,8	13,3
	36	8,8	35,4
<b>Kontrollen</b>	Kontrolle (10 mL Waschwasser/L)	13,0	4,4
	Kontrolle	13,6	6,2

## 6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Versuche zur Auswirkung von verschiedenen Abwasserkomponenten auf die Wirkung von NM-300K, haben gezeigt, dass die Wirkung sehr stark von der Zusammensetzung des Abwassers abhängig ist.

Der größte Einfluss auf die Wirkung von NM-300K in dieser Testreihe zeigte sich bei der Veränderung der Zusammensetzung des synthetischen Abwassers. Das in den Versuchen genutzte synthetische Abwasser besteht sowohl aus organischen Komponenten wie Pepton, Harnstoff und Fleischextrakt als auch aus einer Vielzahl an Salzen. In dem Versuch, in dem der Anteil dieser Inhaltsstoffe halbiert wurde, zeigte sich eine Erhöhung der Toxizität von NM-300K, während bei einer Aufkonzentrierung der Inhaltsstoffe keine Wirkung auf die Respiration der Klärschlammorganismen mehr festzustellen war.

Weder eine Veränderung des pH-Wertes, noch der Zusatz von Waschwasser oder verschiedenen Komplexbildnern beeinflusste die Toxizität von NM-300K auf diese Weise. Bei einer sehr hohen Konzentration (100 mg/L) des Komplexbildners NTA

war keine Wirkung von  $\text{AgNO}_3$  auf die Respirationsrate festzustellen. Der Zusatz des Komplexbildners Calgon und auch der Zusatz von Waschwasser, in dem ebenfalls ein Komplexbildner enthalten war, führten zu keiner Veränderung der Wirkung von NM-300K.

Bei der Veränderung des pH-Wertes zeigte sich, dass die Zugabe von Klärschlamm einen konstanten pH-Wert von 6/7 oder 8 im Testsystem über den Versuchszeitraum von drei Stunden nicht zulässt. Es kommt zu einer Anpassung des pH-Wertes, so dass auftretende Effekte nur schwer zu deuten sind. In den durchgeführten Versuchen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Versuchen mit einem veränderten pH-Wert.

Zusätzlich zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Abwasserkomponenten auf die Wirkung von AgNP war es auch wichtig, die Wirkweise von AgNP zu untersuchen, die wegen ihrer antimikrobiellen Wirkung auf Textilien aufgetragen wurden. Hierzu wurden verschiedene Faserproben bezogen, die im Atmungshemmtest untersucht wurden. Dabei zeigte sich eindeutig, dass eine Wirkung nur bei einem direkten Kontakt zwischen Fasern, in den die AgNP eingearbeitet wurden, und Mikroorganismen verursacht wurde.

## **7 Realistisches Nutzungsszenario – Wirkung von AgNP-haltigem Klärschlamm als landwirtschaftlicher Dünger auf die Bodenmikroorganismen**

In den Kläranlagensimulationen wurde gezeigt, dass ein Großteil von NM-300K nach dem Klärprozess im Klärschlamm wiederzufinden war. Der Klärschlamm, der heutzutage in Kläranlagen anfällt, wird entweder einer Verbrennung zugeführt oder als Dünger auf landwirtschaftlich genutzte Flächen aufgebracht (siehe Kapitel 2.4). Eingearbeitet in Boden wird der Klärschlamm durch die Bodenmikroorganismen abgebaut. Im Rahmen dieses Abbaus liegt die Vermutung nahe, dass es zur Freisetzung von NM-300K kommt. Über die Bioverfügbarkeit und die Wirkung von NM-300K nach einer Freisetzung liegen derzeit keine Daten vor. Ziel dieser Langzeitversuche war es herauszufinden, ob mit NM-300K kontaminierter Klärschlamm über einen Zeitraum von 140 bis 180 Tagen abgebaut wird, und ob gleichzeitig mit diesem Abbau NM-300K wieder freigesetzt wird und die Aktivität der Bodenmikroorganismen beeinflusst.

Die Rahmenbedingung für die Langzeitversuche bildete die deutsche Klärschlammverordnung (§6 Abs.1 AbfKlärV), wonach 5 t TS Klärschlamm je Hektar in 3 Jahren auf einen landwirtschaftlich genutzten Boden aufgebracht werden können. Dies bedeutet, dass für eine angenommene Bodentiefe von 20 cm und eine Bodendichte ( $d_f$ ) von  $1,5 \text{ g/cm}^3$  berechnet wurde, dass in den durchgeführten Versuchen  $1,67 \text{ g TS Klärschlamm/kg TM Boden}$  aufgebracht werden konnte. Dieser Berechnung lag die Annahme zugrunde, dass einmalig die maximale Menge an Klärschlamm, die über 3 Jahre aufgetragen werden darf, aufgetragen wird. In §4 der AbfKlärV sind die Aufbringungsverbote und Beschränkungen geregelt. Die Richtwerte wurden in den hier durchgeführten Versuchen eingehalten. Der Klärschlamm wurde auf einen Boden mit einem pH in destilliertem Wasser von 5,0 – 5,5 aufgebracht. Die Grenzwerte für Schwermetalle wurden ebenfalls, wie in Tabelle 3 ersichtlich, eingehalten.

Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag darin, den Einfluss von NM-300K und als Referenz  $\text{AgNO}_3$ , bei fortschreitendem Abbau von Klärschlamm auf die Bodenmikroorganismen zu untersuchen. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine Freisetzung von NM-300K oder  $\text{AgNO}_3$  bzw. die Bildung von Ag-Ionen eine

Wirkung auf das Wachstum von Pflanzen hervorruft und ob die Pflanzen in der Lage sind den Testgegenstand aufzunehmen. Gemäß dieser Zielsetzung wurden die folgenden Testsysteme in den Langzeitversuchen genutzt:

- Potentielle Ammoniumoxidation nach ISO Richtlinie 15685 (2004)
- C-Transformation nach OECD Richtlinie 217 (2000)
- Basalatmung nach OECD Richtlinie 217 (2000)
- Mikrobielle Bodendiversität nach Richtlinie ISO/TS 22939 (2010)
- Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208 (2006)

Die Durchführung der einzelnen Testsysteme wurde an die Erkenntnisse aus den schrittweise durchgeführten Langzeitversuchen angepasst. Zunächst wurden Messungen an Tag 11 / 32 / 60 / 100 und 180 durchgeführt. Nach dem ersten Versuch wurde der Versuch schon nach 140 Tagen beendet. Dies wurde in den restlichen Versuchen beibehalten. Alle Versuchsansätze umfassten jeweils eine Kontrolle ohne Klärschlamm und eine Klärschlammkontrolle. So wurde zum einen gezeigt, dass der Klärschlamm eine stimulierende Wirkung auf die Aktivität der Bodenmikroorganismen ausübt, zum anderen wurde überprüft zu welchem Zeitpunkt keine Stimulation mehr vorliegt und der Klärschlamm somit abgebaut war.

Alle im Rahmen der Langzeitversuche dargestellten Ergebnisse spiegeln den Vergleich zwischen den Messwerten in der Klärschlammkontrolle und denen der Bodengehalte an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wieder. Neben der tabellarischen Darstellung der einzelnen Ergebnisse wurde zusätzlich eine graphische Darstellung der Ergebnisse angefertigt, um einen besseren Überblick bei der Vielzahl an Ergebnissen zu wahren. Neben den Untersuchungen zur Wirkung auf das terrestrische Ökosystem wurde regelmäßig der pH-Wert in den einzelnen Ansätzen gemäß DIN ISO 10390 (2005) in 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemessen und der Ag-Gehalt im Boden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Hierzu wurden nach 32 und 60 Tagen an jeweils sechs Stellen in den Versuchsgefäßen Proben von je 10 g TM entnommen. Die Proben wurden bei 105°C getrocknet und im Anschluss gemahlen. Danach wurde der Gesamtgehalt an Silber in der Probe bestimmt. Die Proben wurden wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben aufgearbeitet und gemessen. Die Ergebnisse sind zu Beginn der Ergebnisse im Kapitel „Begleitanalytik“ aufgeführt.

## 7.1 Langzeitversuch 1

### 7.1.1 Begleitanalytik im Boden

In Tabelle 39 sind die Mittelwerte aus den Messungen des Gesamtgehaltes an Silber in Boden zu den verschiedenen Zeitpunkten wiedergegeben. Für NM-300K wurden 1,6 und 3,4 mg/kg TM Boden gemessen, für AgNO<sub>3</sub> lagen die Ag-Gehalte im Boden bei 2,1 und 4,0 mg/kg TM Boden. Die Standardabweichungen waren in allen Ansätzen sehr hoch (Tabelle 39).

Der pH-Werte des Bodens, wurde an den Versuchstagen 11 / 100 und 180 gemessen. Die Messungen erfolgten in den beiden Kontrollen und den beiden höchsten Bodengehalten von NM-300K und AgNO<sub>3</sub>. Es zeigte sich, dass der pH-Wert durch die Zugabe von Klärschlamm in das Testsystem abgesenkt wurde. An Tag 11 wurde ein pH-Wert von 5,5 in der Kontrolle gemessen, in der Klärschlammkontrolle und den beiden höchsten Bodengehalten von 4,9 bis 5,0 (Tabelle 39). Mit zunehmender Versuchsdauer nahm der pH-Wert in allen Replikaten weiter ab. Nach 100 Tagen wurden pH-Werte von 4,8 in der Kontrolle und 4,6 in allen Replikaten mit Klärschlamm gemessen. Vergleichbare pH-Werte ergaben sich auch nach 180 Tagen (Tabelle 39). Aufgrund dessen, dass der pH-Wert in Klärschlammkontrolle und den beiden höchsten Konzentrationen über den gesamten Versuchsverlauf vergleichbar war, konnten auftretende Einflüsse auf die Aktivität der Mikroorganismen eindeutig auf NM-300K bzw. AgNO<sub>3</sub> bezogen werden.

**Tabelle 39: Langzeitversuch 1 - Begleitanalytik (pH und Bestimmung der Ag-Gehalte)**

Testgegenstand	Kontrolle	Klärschlamm-kontrolle	NM-300K	NM-300K	AgNO <sub>3</sub>	AgNO <sub>3</sub>
Gemessener Bodengehalt <sup>a</sup> [mg/kg TM Boden] ± Stabw. <sup>b</sup>	0	0	1,6 ± 0,6	3,4 ± 1,9	2,1 ± 0,9	4,0 ± 1,2
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 11)	5,5	5,0	n.b.	4,9	n.b.	4,9
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 100)	4,8	4,6	n.b.	4,6	n.b.	4,6
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 180)	4,7	4,6	n.b.	4,5	n.b.	4,5

<sup>a</sup> Mittelwert aus n=12 Proben; <sup>b</sup> Standardabweichung; <sup>c</sup> in 0,01M CaCl<sub>2</sub>-Lösung

### 7.1.2 Potentielle Ammoniumoxidation

Die Ergebnisse der Potentiellen Ammoniumoxidation an fünf Messzeitpunkten über 180 Tage sind in im Anhang in Tabelle 64 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Nitritproduktion der Nitrifikanten wurde in Abbildung 7 dargestellt. Abbildung 8 zeigt die durch NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  hervorgerufene Wirkung auf die Nitritproduktion. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von  $\leq 15\%$  wurde zu allen Messzeitpunkten erfüllt.

In dem Versuch zeigte sich, dass es bei der ersten Messung nach 11 Tagen zu einer sehr starken Hemmung der Nitrifikanten in allen Replikaten, die Klärschlamm enthielten, kam. Im Vergleich der beiden Kontrollen ergab sich eine Hemmung der Nitritproduktion von 43,4% bei der Klärschlammkontrolle (Abbildung 7). Die Nitritproduktion durch die Nitrifikanten wurde im Vergleich zur Klärschlammkontrolle bei NM-300K mit 56,5 und 63,1%, bei  $\text{AgNO}_3$  mit 10,3 und 40,6% gehemmt (Abbildung 8). Ein anderes Bild zeigte sich nach 32 und 60 Tagen. Die Nitrifikanten in der Klärschlammkontrolle wurden durch den Zusatz von Klärschlamm an Tag 32 um 31,1% und an Tag 60 um 13,6% stimuliert (Abbildung 7). In den Replikaten mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  wurden Nitritwerte auf Niveau der Klärschlammkontrolle gemessen.

Auch nach 100 Tagen wurde die Bildung von Nitrit durch die Nitrifikanten in der Klärschlammkontrolle weiterhin gefördert. Es ergab sich ein Unterschied von 31,9% im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 7). Erste statistisch signifikante Unterschiede zur Klärschlammkontrolle wurden sowohl in den Replikaten mit NM-300K als auch mit  $\text{AgNO}_3$  nach 100 Tagen gemessen. Bei den Replikaten mit NM-300K ergaben sich für einen Bodengehalt von 3,4 mg/kg TM Boden eine signifikante Hemmung von 33,2% (Abbildung 8). Ein vergleichbares Bild ergab sich für  $\text{AgNO}_3$ . Bei einem Bodengehalt von 4,0 mg/kg TM Boden wurden die Nitrifikanten in der Nitritproduktion um 41,3% gehemmt (Abbildung 8).

Nach 180 Tagen wurden sowohl für NM-300K als auch  $\text{AgNO}_3$  Hemmungen der Nitritproduktion, die abhängig vom Bodengehalt waren, gemessen. Der Vergleich der Kontrollen nach 180 Tagen zeigte, dass die Nitritproduktion in der Klärschlammkontrolle um 17,4% im Vergleich zur Kontrolle gehemmt wurde (Abbildung 7). In den Versuchsansätzen mit NM-300K kam es bei einem Bodengehalt von 3,4 mg/kg TM Boden zu einer signifikanten Hemmung der Nitritproduktion von 51,4%. Für die  $\text{AgNO}_3$  haltigen Versuchsansätze ergab sich ein

signifikanter Unterschied von 37,9% zur Klärschlammkontrolle bei einem Gehalt von 2,1 mg/kg TM Boden und von 85,5% bei einem Bodengehalt von 4,0 mg/kg TM Boden (Abbildung 8).

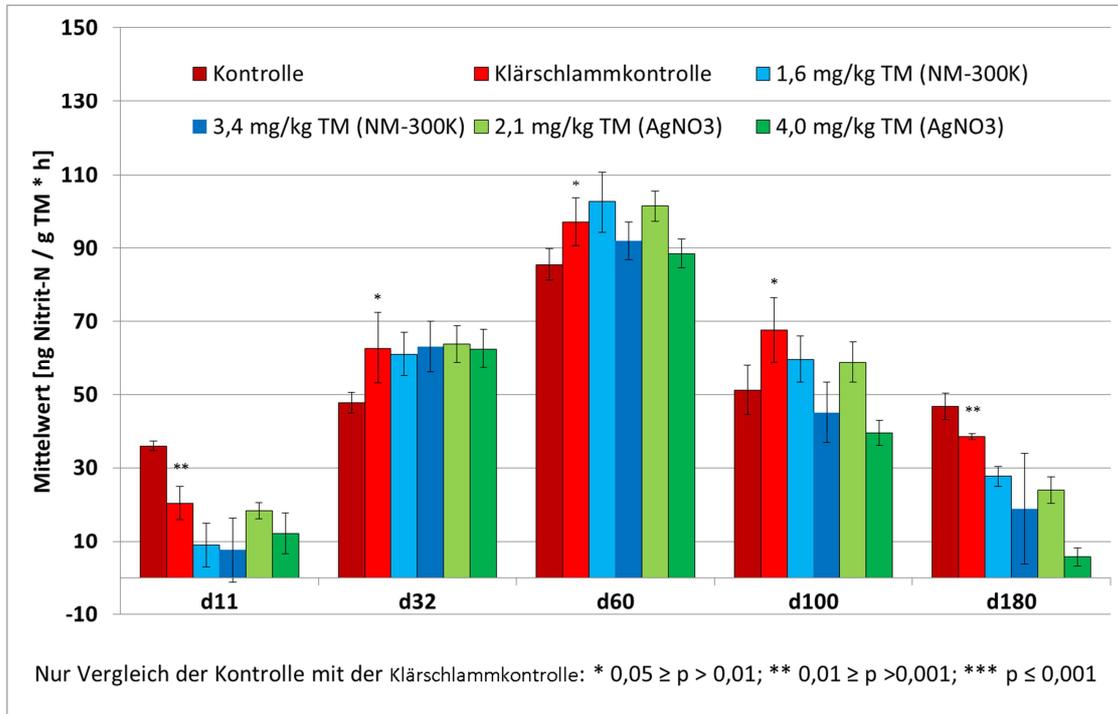


Abbildung 7: Langzeitversuch 1 – Nitritproduktion

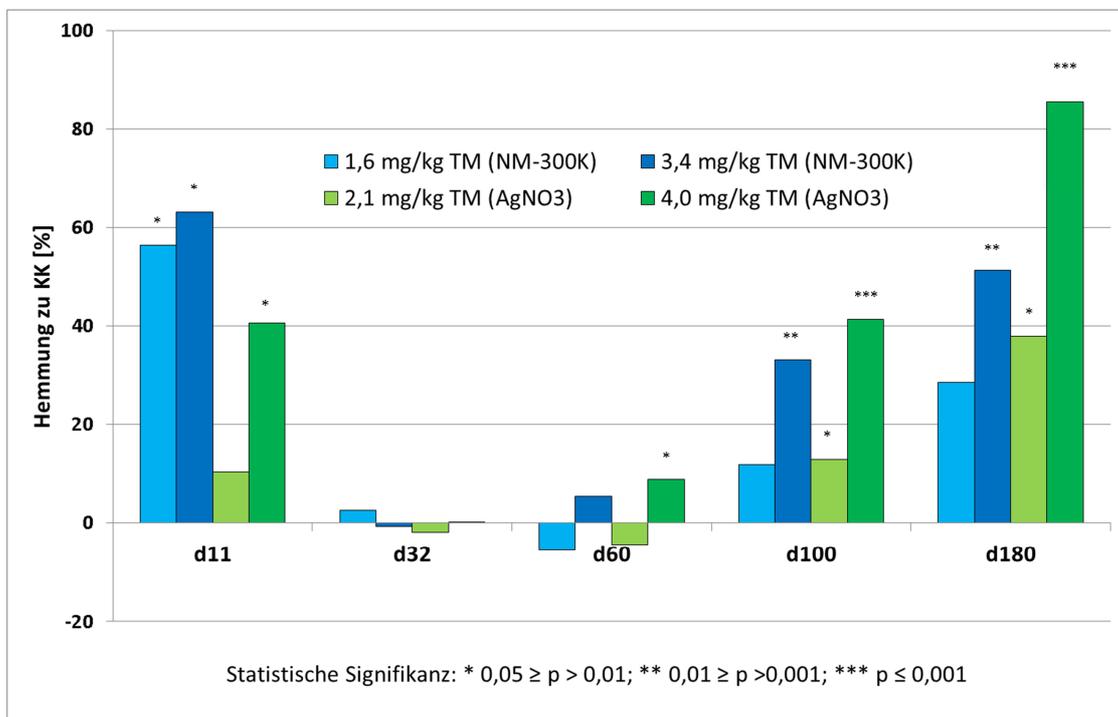


Abbildung 8: Langzeitversuch 1 – Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)

### 7.1.3 C-Transformation

Die Ergebnisse der C-Transformation sind im Anhang in Tabelle 65 (Kapitel 13.2, Anhang) dargestellt. Die mikrobielle Biomasse an den einzelnen Messzeitpunkten wurde in Abbildung 9 dargestellt. Abbildung 10 zeigt die dazugehörige, durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufene, Wirkung auf die mikrobielle Biomasse. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von  $\leq 15\%$  wurde zu allen Messzeitpunkten erfüllt.

An Tag 11 zeigte sich, dass die mikrobielle Biomasse durch die Zugabe von Klärschlamm gefördert wurde. Im Vergleich der Klärschlammkontrolle mit der Kontrolle ergab sich eine, durch den Klärschlamm hervorgerufene, Stimulation der mikrobiellen Biomasse von 14,8% (Abbildung 9). Aufgrund des hohen Variationskoeffizienten war die Stimulation der mikrobiellen Biomasse statistisch nicht signifikant. Im Vergleich der Versuchsansätze mit verschiedenen Gehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede. Ein vergleichbares Bild zeigte sich nach 32 Tagen, wobei die Klärschlammkontrolle auf einem Niveau mit der Kontrolle lag.

An Tag 60 wurde die mikrobielle Biomasse bei einem Bodengehalt von 4,0 mg/kg TM Boden durch AgNO<sub>3</sub> um 21,7% gehemmt (Abbildung 10). Die Messungen in den Kontrollen ergaben vergleichbare Werte der Biomasse. An Tag 100 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der mikrobiellen Biomasse der beiden Kontrollen. Bei einem Bodengehalt von 1,6 mg/kg TM Boden für NM-300K kam es zu einer Hemmung von 28,3%, bei einem Gehalt von 3,4 mg/kg TM nahm die Hemmung leicht ab und lag bei 23,3%. Die mikrobielle Biomasse wurde an Tag 100 in vergleichbarem Maße durch AgNO<sub>3</sub> gehemmt. Hier ergab sich eine Hemmung bei 2,1 mg/kg TM Boden von 23,3% und bei 4,0 mg/kg TM Boden von 30,8% (Abbildung 10). Nur bei einem Bodengehalt von 4,0 mg/kg TM Boden waren die Unterschiede aufgrund der hohen Variationskoeffizienten statistisch signifikant.

Nach 180 Tagen war die mikrobielle Biomasse in den einzelnen Versuchsansätzen mit Testgegenstand nur schwach ausgeprägt. Die Kontrolle mit Klärschlamm war bei dieser Messung im Vergleich zur Kontrolle ohne Klärschlamm um 21,5% vermindert (Abbildung 9). Bei einem Bodengehalt von 1,6 mg/kg TM Boden für NM-300K ergab sich eine Hemmung im Vergleich zur Klärschlammkontrolle von 42,2%. Bei allen anderen untersuchten Bodengehalten für NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurde die mikrobielle

Biomasse um 42,9% gehemmt (Abbildung 10). Die an Tag 180 gemessenen Unterschiede in der Biomasseentwicklung, hervorgerufen durch NM-300K und  $\text{AgNO}_3$ , waren alle statistisch signifikant.

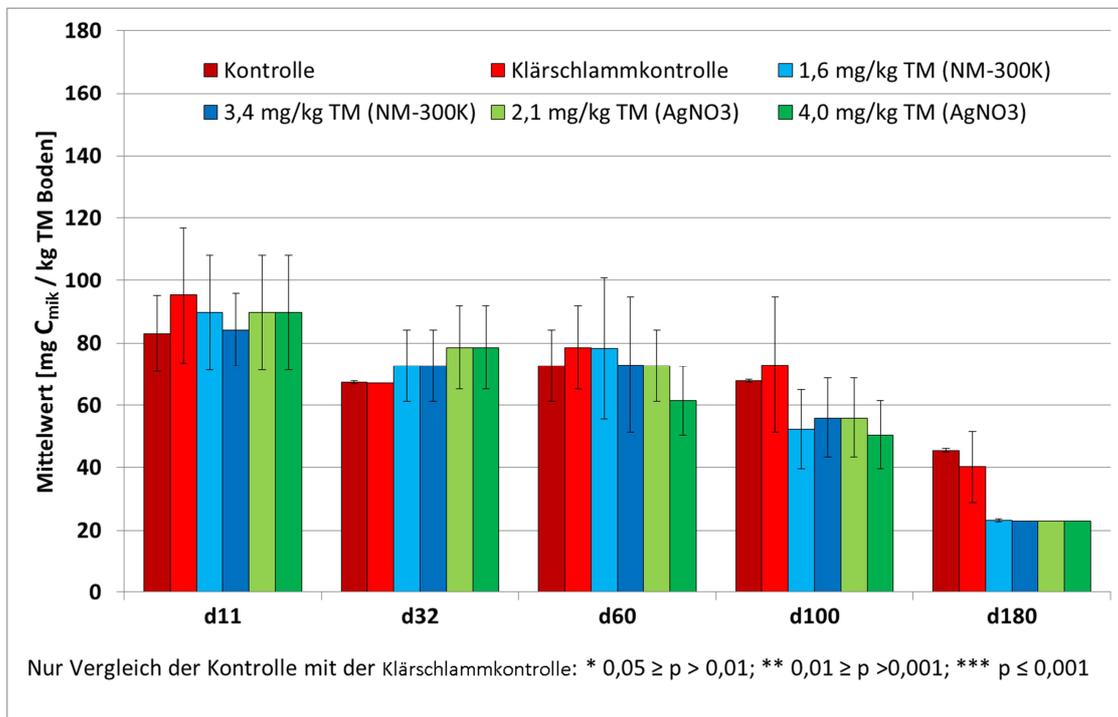


Abbildung 9: Langzeitversuch 1 – Mikrobielle Biomasse

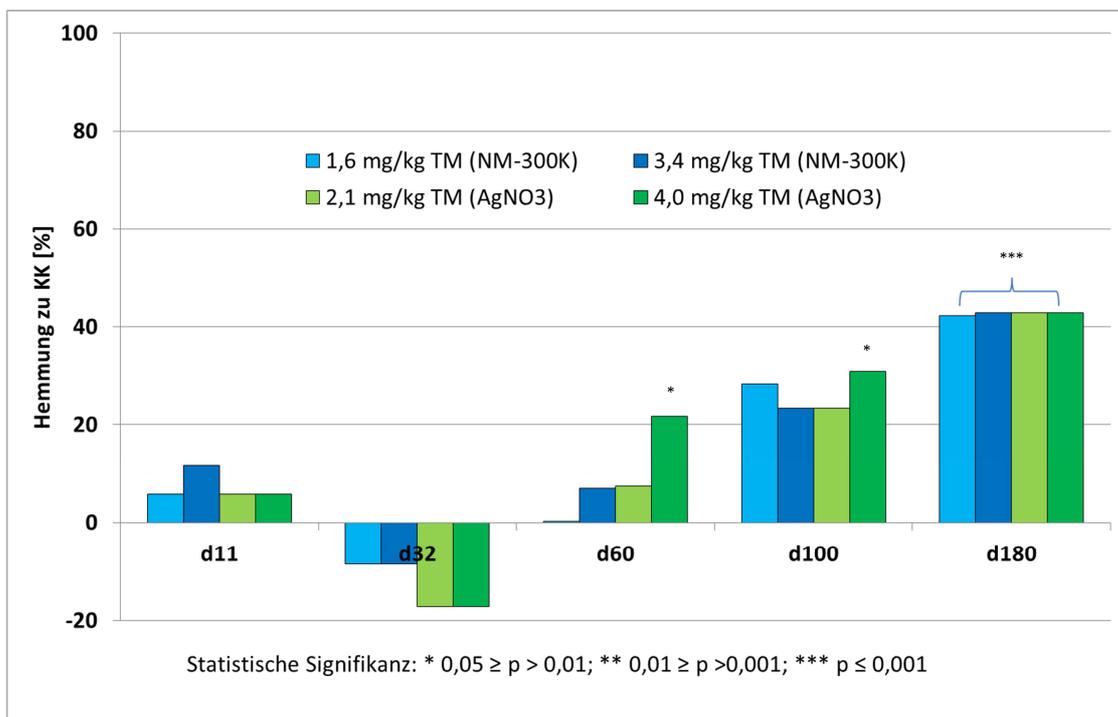


Abbildung 10: Langzeitversuch 1 - Hemmung der mikrobiellen Biomasse durch NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)

#### 7.1.4 Mikrobielle Bodendiversität

An Tag 32 und 100 wurde die mikrobielle Bodendiversität betrachtet. Sechs fluorogene Substrate, die stellvertretend für einen bestimmten Abbauprozess von Makromolekülen standen, wurden untersucht. Die Ergebnisse der mikrobiellen Bodendiversität sind im Anhang in Tabelle 66 (Kapitel 13.2, Anhang) aufgeführt. Die Enzymaktivität und die Wirkung von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  im Vergleich zur Klärschlammkontrolle wurde in Abbildung 11 (Tag 32) und Abbildung 12 (Tag 100) graphisch dargestellt.

An Tag 32 zeigte sich, dass es zu keiner Hemmung der verschiedenen Mikroorganismengruppen kam. Es kam allerdings zu Stimulationen, hervorgerufen durch die verschiedenen Bodengehalte von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  im Vergleich mit der Klärschlammkontrolle. Das Substrat 4-MUF- $\beta$ -D-glucopyranosid wurde bei einem Bodengehalt an  $\text{AgNO}_3$  von 2,1 mg/kg TM Boden stärker abgebaut, wodurch es zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz kam. Dieser Anstieg wurde weder für den höheren Gehalt an  $\text{AgNO}_3$  noch für NM-300K festgestellt. Auch der Abbau von 4-MUF-phosphat, der die Hydrolyse von Phosphatestern darstellt, wurde bei einem Bodengehalt an NM-300K von 3,4 mg/kg TM Boden und 2,1 mg/kg TM Boden  $\text{AgNO}_3$  signifikant gefördert. Die Hydrolyse von Oligopeptiden (Aminosäuren), welche durch den Abbau von L-Leucin-AMC und L-Alanin-AMC gekennzeichnet wird, wurde jeweils durch beide Bodengehalte an NM-300K und durch einen Gehalt von 2,1 mg/kg TM Boden an  $\text{AgNO}_3$  signifikant gesteigert.

An Tag 100 zeigte sich ein verändertes Bild bei der mikrobiellen Bodendiversität. Der Abbau von 4-MUF-Nacetyl- $\beta$ -D-glucosaminid wurde stark gehemmt. Für NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich mit der Klärschlammkontrolle und es zeigte sich jeweils eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung. Der Abbau von Chitin durch die Aufspaltung von  $\beta$ -1-4-glycosidischen Bindungen zu N-acetyl-glucosaminid und Chitobiose wurde somit stark durch die Zugabe von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  beeinflusst. Die Hydrolyse von Oligopeptiden wurde ebenfalls durch NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  gehemmt. Der Abbau des fluorogenen Substrates L-Leucin-AMC wurde jeweils in den beiden höheren Bodengehalten an NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  signifikant gehemmt. Obwohl die Unterschiede zu Klärschlammkontrolle in den beiden niedrigen Bodengehalten nicht statistisch signifikant waren, ist doch eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung erkennbar. Dieses ist ebenso bei dem Substrat L-

Alanin-AMC der Fall, wobei hier nur in dem höchsten Bodengehalt an AgNO<sub>3</sub> ein statistisch signifikanter Unterschied zur Klärschlammkontrolle vorliegt. Die Hydrolyse von Phosphatestern wird wie an Tag 32 weiterhin im Vergleich zur Klärschlammkontrolle stimuliert. Eine statistische Signifikanz ergab sich hier allerdings nur für einen Bodengehalt an NM-300K von 1,6 mg/kg TM Boden.

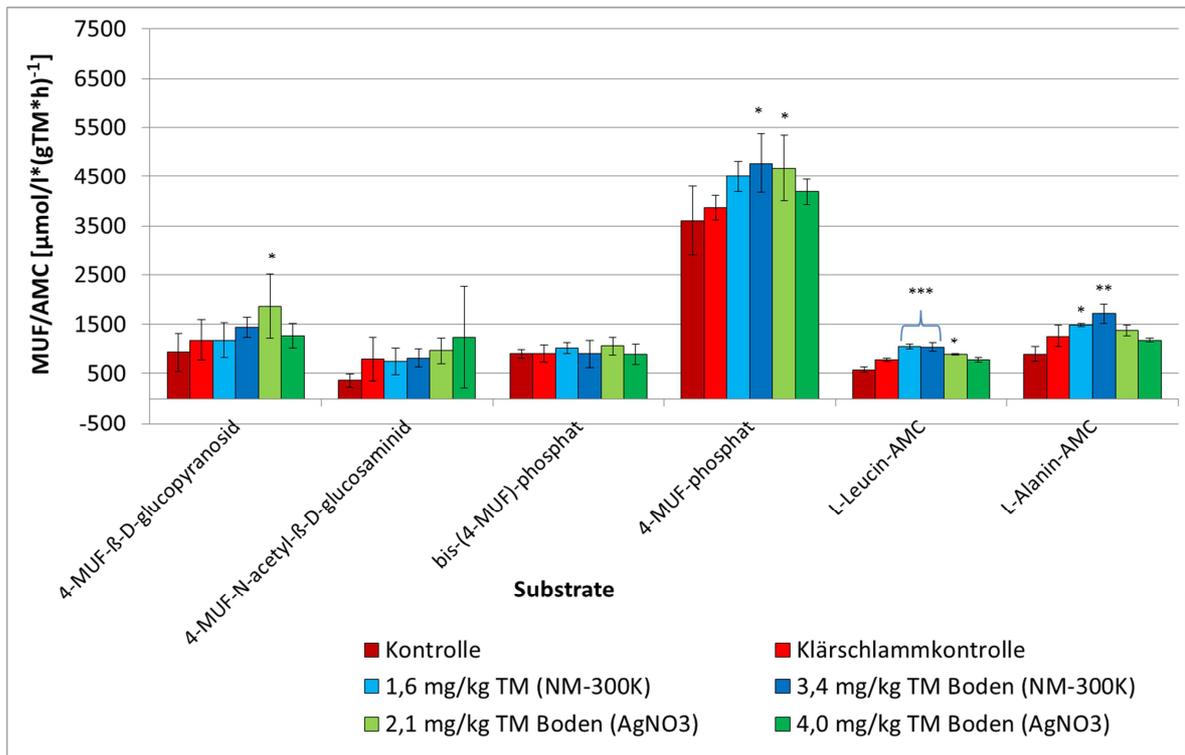


Abbildung 11: Langzeitversuch 1 - Enzymaktivität von Bodenmikroorganismen nach 32 Tagen

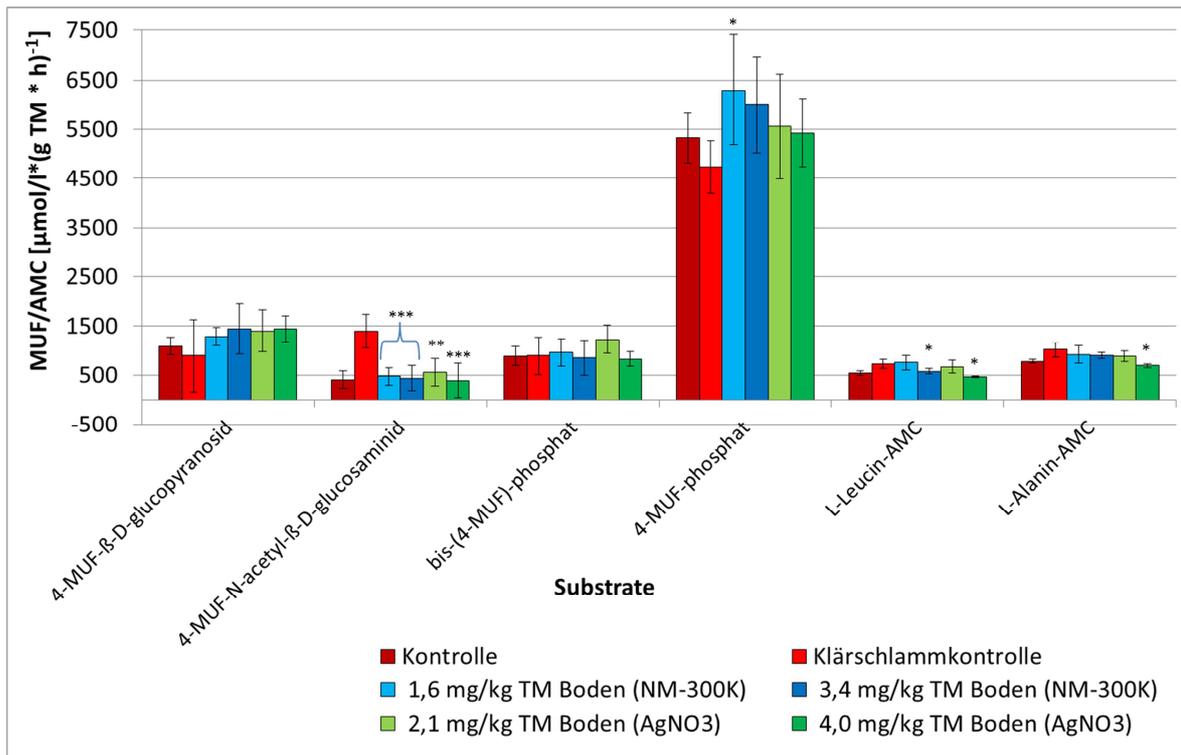


Abbildung 12: Langzeitversuch 1 - Enzymaktivität von Bodenmikroorganismen nach 100 Tagen

### 7.1.5 Pflanzentest

Nach 180 Tagen wurde mit dem Versuchsboden ein Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208 durchgeführt. Der Versuch wurde wie in Abschnitt 4.4.6 durchgeführt. In allen Replikaten der Kontrolle waren insgesamt mehr als 70% der Samen aufgegangen und die Mortalität der aufgegangenen Keimlinge betrug weniger als 10%, womit die Validitätskriterien erfüllt wurden. Es wurden keine Nekrosen oder Chlorosen im Verlauf des Versuchs festgestellt. In Tabelle 40 sind die Ergebnisse dieses Versuchs aufgeführt. Zum Abschluss des Pflanzentests wurden die Pflanzen zusätzlich in Wurzel, Spross und Blätter unterteilt, bei 70°C über Nacht im Trockenschrank getrocknet, gemahlen und dann auf den Ag-Gesamtgehalt untersucht. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Tabelle 41 dargestellt.

Das Pflanzenwachstum in den Replikaten der Kontrolle lag bei 11,3 g/Testgefäß, in den Replikaten der Klärschlammkontrolle bei 10,6 g/Testgefäß (Tabelle 40). Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt, in den mit Klärschlamm versetzten Ansätzen konnte weder eine hemmende noch eine stimulierende Wirkung auf das Pflanzenwachstum nach 180 Tagen festgestellt werden. In den Replikaten mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurde ein vermindertes Pflanzenwachstum festgestellt.

Hierbei zeigten sich allerdings keine Abhängigkeiten von dem Bodengehalt an NM-300K oder  $\text{AgNO}_3$ . Bei NM-300K ergab sich bei einem Bodengehalt von 1,6 mg/kg TM Boden eine Hemmung des Pflanzenwachstums von 27,5%. In dem höheren Bodengehalt von 3,4 mg/kg TM Boden zeigte sich eine Hemmung von 25,5%, die allerdings nicht statistisch signifikant war. Für  $\text{AgNO}_3$  wurde bei einem Bodengehalt von 2,1 mg/kg TM Boden eine Hemmung von 26,6% und eine Hemmung von 18,3% bei einem Bodengehalt von 4,0 mg/kg TM Boden bestimmt. Auch hier war der Unterschied zur Klärschlammkontrolle statistisch nicht signifikant.

Bei den Messungen des Ag-Gesamtgehaltes in den einzelnen Pflanzenteilen (Wurzel, Spross, Blätter) wurde Silber in allen drei Pflanzenteilen gemessen. Der größte Anteil an Silber konnte in den Wurzeln gemessen werden. In den beiden Kontrollen mit und ohne Klärschlamm wurden nur geringe Mengen an Silber gemessen. Hier wurden im Maximum 0,1  $\mu\text{g/g}$  TM Wurzel in den Wurzeln gemessen (Tabelle 41).

Trotz vergleichbarer Bodengehalte wurde für NM-300K im Vergleich mit  $\text{AgNO}_3$  ein größerer Ag-Gehalt in den jeweiligen Pflanzenteilen gemessen. In den Pflanzenteilen, der Replikate mit NM-300K  $\text{AgNO}_3$  war der Gehalt in den Pflanzenteilen abhängig vom Bodengehalt. In den Wurzeln wurde die größte Menge an Silber gemessen. Für NM-300K wurden Ag-Gehalte in der Wurzel von 11,6 – 21,4  $\mu\text{g/g}$  TM Wurzel, für  $\text{AgNO}_3$  von 3,2 bis 12,0  $\mu\text{g/g}$  TM Wurzel gemessen (Tabelle 41).

Eine vergleichbare Abstufung ergab sich für den Ag-Gehalt im Spross, sowohl für NM-300K als auch  $\text{AgNO}_3$ . In den beiden niedrigeren Bodengehalten von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  fiel auf, dass der Gehalt an Silber in den Blättern größer als im Spross war. Während bei NM-300K bei einem Bodengehalt von 1,6 mg/kg TM Boden ein Ag-Gehalt von 0,35  $\mu\text{g/g}$  TM Spross gemessen wurde, lag der Messwert für die Blätter mit 0,46  $\mu\text{g/g}$  TM Blätter leicht darüber (Tabelle 41).

Ein vergleichbares Verhalten zeigte sich bei  $\text{AgNO}_3$  bei einem Bodengehalt von 2,1 mg/kg TM Boden. Hier wurde ein Ag-Gehalt von 0,14  $\mu\text{g/g}$  TM Spross und von 0,21  $\mu\text{g/g}$  TM Blätter gemessen (Tabelle 41). Dieses Verhalten wurde bei den beiden größeren Bodengehalten nicht beobachtet.

Tabelle 40: Langzeitversuch 1 - Pflanzentest mit *Phaseolus aureus* L. nach 180 Tagen

Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Keimrate [%]	Mortalität [%]	Frischgewicht [g/Testgefäß] ± Stabw. <sup>a</sup>	Hemmung des Wachstums im Vergleich zur KK [%]
Kontrolle	100	0	11,255 ± 1,295	-
Klärschlammkontrolle (KK)	100	0	10,603 ± 2,401	-
1,6 (NM-300K)	85	0	7,686 ± 3,187	27,5*
3,4 (NM-300K)	95	0	7,900 ± 0,980	25,5
2,1 (AgNO <sub>3</sub> )	80	0	7,784 ± 2,056	26,6
4,0 (AgNO <sub>3</sub> )	90	0	8,663 ± 3,994	18,3

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Tabelle 41: Langzeitversuch 1 - Ag-Gehalt in Wurzeln, Spross und Blättern

Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Ag-Gehalt Wurzel [µg/g] ± Stabw. <sup>a</sup>	Ag-Gehalt Spross [µg/g] ± Stabw. <sup>a</sup>	Ag-Gehalt Blätter [µg/g] ± Stabw. <sup>a</sup>
Kontrolle	0,123 ± 0,005	0,048 ± 0,012	0,020 ± 0,0001
Klärschlammkontrolle (KK)	0,101 ± 0,005	0,022 ± 0,0002	0,035 ± 0,016
1,6 (NM-300K)	11,600 ± 0,585	0,346 ± 0,004	0,464 ± 0,019
3,4 (NM-300K)	21,442 ± 2,406	1,675 ± 0,026	0,110 ± 0,0002
2,1 (AgNO <sub>3</sub> )	3,173 ± 0,301	0,137 ± 0,011	0,210 ± 0,026
4,0 (AgNO <sub>3</sub> )	11,989 ± 0,557	0,799 ± 0,005	0,085 ± 0,006

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

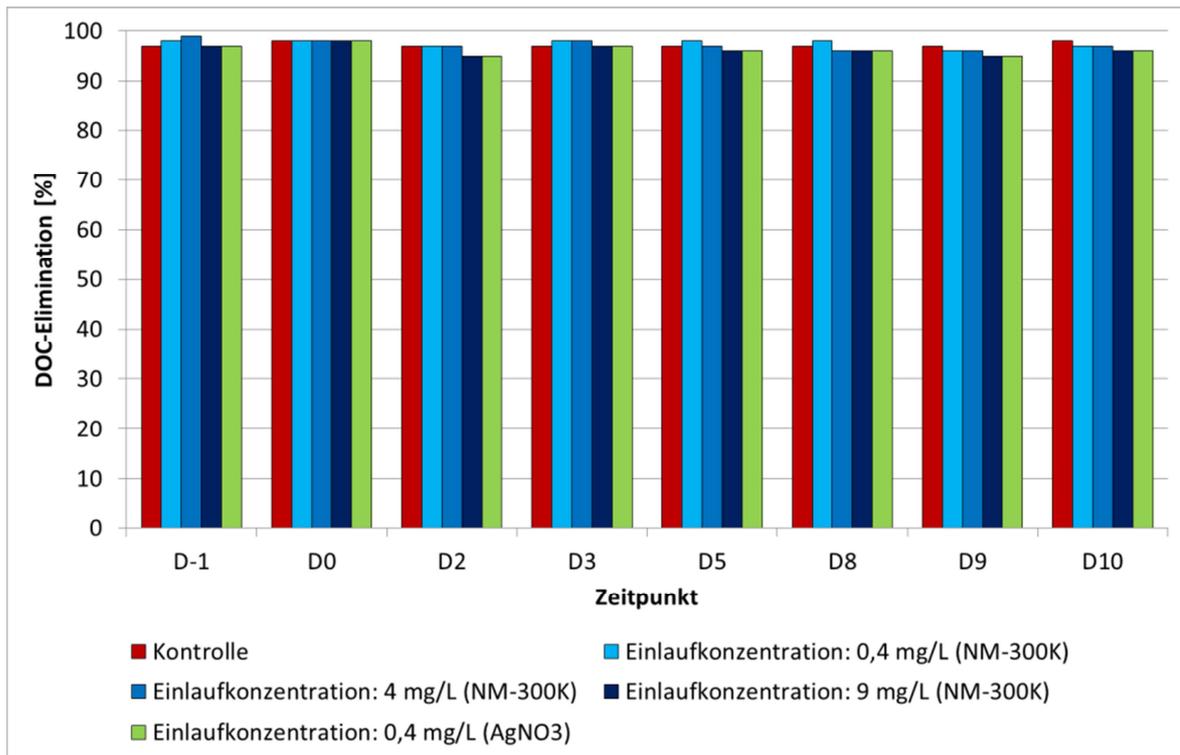
## 7.2 Langzeitversuch 2

Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben durchgeführt, die maximale Dauer des Versuchs betrug im Gegensatz zu Versuch 1 nur noch 140 Tage.

### 7.2.1 Kläranlagensimulation

Die Applikation von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurde in diesem Langzeitversuch mit Hilfe einer Kläranlagensimulation über 10 Tage vorgenommen. In Tabelle 42 sind die Messungen des Ag-Gehaltes in Ein- und Auslaufproben über den Zeitraum der Zugabe von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> in die Kläranlagen wiedergegeben. Die verschiedenen Parameter der Begleitanalytik (pH-Werte, TS-Gehalte und

Wasserchemie) zu den jeweiligen Kläranlagen wurden im Anhang in Tabelle 67 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Einzelwerte der DOC-Elimination im Verlauf der Kläranlagensimulation sind ebenfalls in Kapitel 13 (Anhang) in Tabelle 68 (Kapitel 13.2, Anhang) aufgeführt, der Verlauf wurde graphisch in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13: Langzeitversuch 2 - DOC-Elimination in der Kläranlagensimulation**

Die Messungen des Ag-Gehaltes zeigen, dass auch bei hohen Einlaufkonzentrationen über einen Zeitraum von 10 Tagen der Großteil an NM-300K im Klärschlamm wiederzufinden war. Auch bei einer Einlaufkonzentration von 9 mg/L wurden zwischen 76 und 92% an NM-300K im Klärschlamm lokalisiert. Für eine Zugabe von 0,4 mg/L an AgNO<sub>3</sub> zeigte sich, dass nahezu 100% im Klärschlamm verblieben (Tabelle 42).

**Tabelle 42: Langzeitversuch 2 - Bilanzierung des Verbleibs von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> in der Kläranlage**

Versuchstag	Ag-Gehalt des Einlaufs [mg/L]	Ag-Gehalt des Auslaufs [mg/L]	Prozentualer Anteil Ag an Klärschlamm [%]
<b>Anlage 1: Kontrolle</b>			
D1	< NG	< NG	n.b.
D10	< NG	< NG	n.b.
<b>Anlage 2: 0,4 mg/L (NM-300K)</b>			
D1	0,347	0,0152	96
D3	0,341	0,0405	88
D5	0,332	0,0423	87
D8	0,324	0,0466	86
D10	0,284	0,0328	88
<b>Anlage 3: 4 mg/L (NM-300K)</b>			
D1	2,618	0,0915	97
D3	2,421	0,123	95
D5	2,678	0,265	90
D8	2,127	0,305	86
D10	1,791	0,317	82
<b>Anlage 4: 9 mg/L (NM-300K)</b>			
D1	2,705	0,431	84
D3	3,575	0,548	85
D5	2,198	0,535	76
D8	3,572	0,414	88
D10	3,286	0,277	92
<b>Anlage 4: 0,4 mg/L (AgNO<sub>3</sub>)</b>			
D1	0,2230	0,0005	100
D3	0,1500	< NG	100
D5	0,2190	< NG	100
D8	0,3140	0,0009	100
D10	0,2510	0,0028	99

NG: Nachweisgrenze; n.b.: nicht bestimmt

Innerhalb der Vorlaufphase lag die Elimination des DOC in allen Anlagen bei einem Wert von  $\geq 80\%$ , so dass nach drei Tagen Stammsuspension in die Anlagen eingeleitet wurde. In allen fünf Anlagen wurde über den gesamten Versuchszeitraum eine DOC-Elimination von 95 bis 98% ermittelt (Abbildung 13). Die Abbauleistung des DOC durch die Mikroorganismen des Klärschlammes wurde durch keine der in die Kläranlagen eingeleiteten Konzentration an NM-300K oder  $\text{AgNO}_3$  beeinflusst. Bei Betrachtung der Kläranlagen in die NM-300K bzw.  $\text{AgNO}_3$  dosiert wurde, konnte wie in den ersten beiden Kläranlagensimulationen (siehe 5.8) eine zunehmende Dunkelfärbung des Klärschlammes beobachtet werden.

### 7.2.2 Begleitanalytik im Boden

In Tabelle 43 sind die Mittelwerte aus den Messungen des Gesamtgehaltes an Silber im Boden zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgeführt. Für NM-300K wurden Bodengehalte von 2,8 / 19,0 und 46,8 mg/kg TM Boden gemessen, für  $\text{AgNO}_3$  lagen der Ag-Gehalt im Boden bei 2,5 mg/kg TM Boden. Die Standardabweichung war in allen Ansätzen gering (Tabelle 43).

Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von Klärschlamm in dem Testsystem abgesenkt. Zu Versuchsbeginn wurde in den Kontrollen ein pH-Wert von 5,0 (Kontrolle) und 5,3 (Klärschlammkontrolle) gemessen. Der pH-Wert mit verschiedenen Bodengehalten an NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  lag ebenfalls in diesem Bereich (Tabelle 43). Aufgrund dessen, dass der pH-Wert in Klärschlammkontrolle und den beiden höchsten Konzentrationen vergleichbar war, wurde eine Beeinflussung der Aktivität der Mikroorganismen ausgeschlossen. Mit zunehmender Versuchsdauer nahm der pH-Wert in den Kontrollen und bei den verschiedenen Bodengehalten an NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  ab, wobei die Abnahme des pH-Wertes in den Replikaten mit Klärschlamm (z.B. Klärschlammkontrolle: pH 5,3 an Tag 11; pH 4,5 an Tag 140) im Vergleich zur Kontrolle (pH 5,0 an Tag 11; pH 4,8 an Tag 140) geringfügig stärker war. Nach 100 Tagen wurden pH-Werte von 4,8 in der Kontrolle und 4,4 bis 4,7 in allen Replikaten mit Klärschlamm gemessen. Vergleichbare pH-Werte ergaben sich auch nach 140 Tagen (Tabelle 43).

Tabelle 43: Langzeitversuch 2 - Begleitanalytik (pH-Werte und Ag-Gehalte)

	Kontrolle	Klärschlamm- kontrolle	NM-300K			AgNO <sub>3</sub>
Gemessener Bodengehalt <sup>a</sup> [mg/kg TM Boden] ± Stabw. <sup>b</sup>	0	0	2,8 ± 0,2	19,0 ± 1,4	46,8 ± 2,9	2,5 ± 0,5
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 11)	5,0	5,3	5,0	5,1	5,2	5,0
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 32)	4,9	4,7	4,8	4,6	4,9	4,5
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 60)	4,8	4,4	4,4	4,4	4,5	4,4
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 100)	4,8	4,5	4,4	4,6	4,7	4,5
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 140)	4,8	4,5	4,4	4,6	4,6	4,5

<sup>a</sup> Mittelwert aus n=12 Proben; <sup>b</sup> Standardabweichung; <sup>c</sup> Gemessen in 0,01M CaCl<sub>2</sub>-Lösung

### 7.2.3 Potentielle Ammoniumoxidation

Die Ergebnisse der Potentiellen Ammoniumoxidation wurden im Anhang in Tabelle 69 (Kapitel 13.2, Anhang) aufgeführt. Die Nitritproduktion durch die Nitrifikanten wurde in Abbildung 14 dargestellt. Abbildung 15 zeigt die dazugehörige, durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufene, Wirkung auf die Nitritproduktion. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von ≤ 15% wurde erfüllt.

Es zeigte sich, dass es bei der ersten Messung nach 11 Tagen zu einer sehr starken Hemmung der Nitrifikanten im Boden bei allen Versuchsansätzen, die Klärschlamm enthielten, auch der Klärschlammkontrolle, kam. Dies war ebenfalls in dem ersten Langzeitversuch beobachtet worden. Der Vergleich der beiden Kontrollen ergab eine signifikante Hemmung der Nitrifikanten von 84,4% in der Kontrolle, die Klärschlamm enthielt (Abbildung 14). Die Unterschiede im Vergleich zwischen Klärschlammkontrolle und den Versuchsansätzen mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> zeigten keine statistische Signifikanz.

Nach 32 Tagen war die Nitritproduktion in der Klärschlammkontrolle weiterhin im Vergleich zur Kontrolle gehemmt. Die Hemmung war auf 24,5% gesunken, jedoch noch immer statistisch signifikant. Die Nitritproduktion der Nitrifikanten wurde bei Bodengehalten von 2,8 und 46,8 mg/kg TM Boden, um 33,7% und 66,1% durch NM-300K gehemmt. Es kam zu keiner signifikanten Hemmung bei einem Bodengehalt

von 19,0 mg/kg TM Boden und auch bei einem Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden wurde keine Wirkung auf die Nitritproduktion festgestellt (Abbildung 15).

Bei den drei Bodengehalten an NM-300K stellte sich nach 60 Tagen eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung ein. In der Klärschlammkontrolle ergab sich nach 60 Tagen im Vergleich mit der Kontrolle ein signifikanter Unterschied von 18,0% (Abbildung 14). Bei einem Bodengehalt von 2,8 mg/kg TM ergab sich eine Hemmung der Nitrifikanten von 27,0%, die mit steigendem Gehalt an NM-300K bis auf 85,7% bei 46,8 mg/kg TM Boden zunahm (Abbildung 15). Erneut konnte für einen Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden für  $\text{AgNO}_3$  keine Wirkung auf die Nitrifikanten gemessen werden.

Nach 100 Tagen wurde die Nitritproduktion in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle leicht gehemmt. Es ergab sich zwischen den beiden Kontrollen ein signifikanter Unterschied von 17,3% (Abbildung 14). Die hemmende Wirkung durch NM-300K, die sich nach 60 Tagen ergeben hatte, wurde an Tag 100 bestätigt. Die Gehalts-Wirkungs-Beziehung war nicht mehr so stark ausgeprägt, da die Hemmung bei einem Bodengehalt von 19,0 mg/kg TM Boden auf 87,3% angestiegen war (Abbildung 15). Auch nach 100 Tagen konnte bei einem Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden für  $\text{AgNO}_3$  kein statistisch signifikanter Unterschied zur Klärschlammkontrolle festgestellt werden.

Am Ende des Versuchs wurde ein statistisch signifikanter Unterschied von 28,9% zwischen der Nitritproduktion in der Kontrolle und der Klärschlammkontrolle gemessen (Abbildung 14). Die Hemmung auf die Nitrifikanten durch NM-300K war in den beiden höchsten Bodengehalten auf 99,0% (19,0 mg/kg TM Boden) und 93,1% (46,8 mg/kg TM Boden) angestiegen. Auch in dem niedrigsten Bodengehalt von 2,8 mg/kg TM Boden zeigte sich ein Anstieg der hemmenden Wirkung auf 65,4%. Bei einem Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden für  $\text{AgNO}_3$  ergab sich nach 140 Tagen ebenfalls eine Hemmung, die mit 82,7% im Vergleich zur Klärschlammkontrolle sehr stark ausgeprägt war (Abbildung 15).

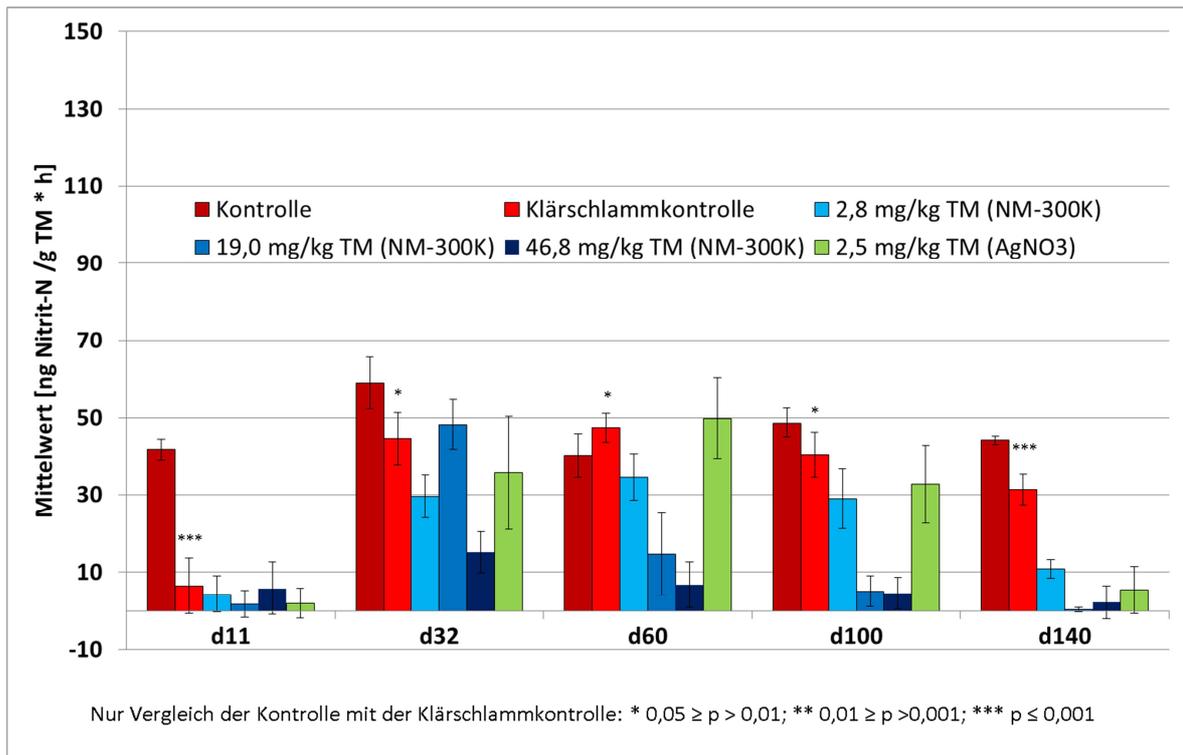


Abbildung 14: Langzeitversuch 2 – Nitritproduktion

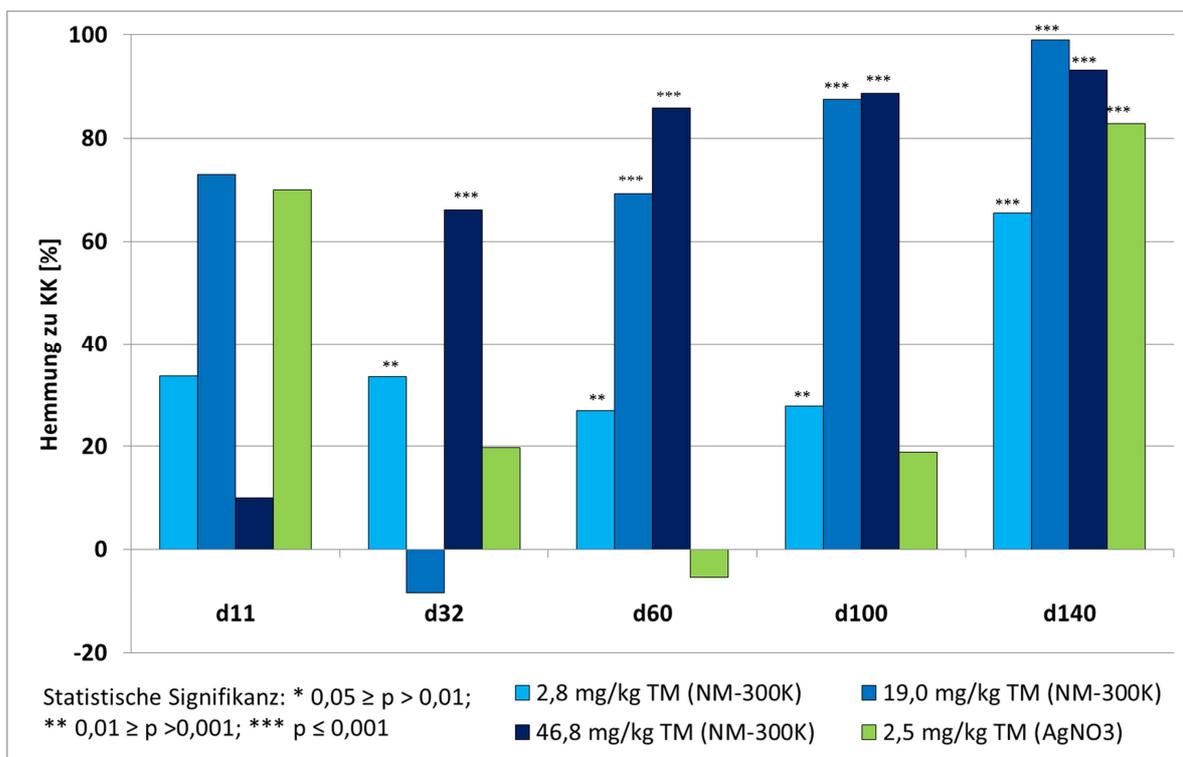


Abbildung 15: Langzeitversuch 2 - Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)

#### 7.2.4 C-Transformation

Die Ergebnisse der C-Transformation wurden im Anhang in Tabelle 70 (Kapitel 13.2, Anhang) aufgeführt. Die Entwicklung der mikrobiellen Biomasse und signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Klärschlammkontrolle wurden in Abbildung 16 dargestellt. Effekte, hervorgerufen durch NM-300K und  $\text{AgNO}_3$ , wurden in Abbildung 17 dargestellt. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von  $\leq 15\%$  wurde erfüllt.

An Tag 11 zeigte sich, dass die mikrobielle Biomasse durch die Zugabe von Klärschlamm gefördert wurde. Im Vergleich der Kontrolle mit der Klärschlammkontrolle ergab sich eine durch den Klärschlamm hervorgerufene Stimulation der mikrobiellen Biomasse von 67,4% (Abbildung 16). Auch im Vergleich der Klärschlammkontrolle mit den verschiedenen Bodengehalten an NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede. Bei NM-300K kam es ab einem Bodengehalt von 19,0 mg/kg TM Boden zu einer Hemmung der mikrobiellen Biomasse von 14,8%, bei einem Gehalt von 46,8 mg/kg TM Boden von 37,1%. Auch durch  $\text{AgNO}_3$  wurde die mikrobielle Biomasse bei einem Gehalt von 2,5 mg/kg TM Boden um 22,2% reduziert (Abbildung 17). Ein vergleichbares Bild zeigte sich nach 32 Tagen, wobei die Stimulation in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle auf 29,3% gesunken war (Abbildung 16).

An Tag 60 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der mikrobiellen Biomasse der beiden Kontrollen. NM-300K zeigte keine Wirkung in den beiden niedrigeren Bodengehalten. Nur bei einem Bodengehalt von 46,8 mg/kg TM Boden wurde eine statistisch signifikante Hemmung der mikrobiellen Biomasse gemessen, die mit 36,2% vergleichbar mit der Hemmung an Tag 11 und 32 war (Abbildung 17).

Die Messungen an Tag 100 zeigten eine Hemmung der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle von 44,6%, wobei der Variationskoeffizient in der Klärschlammkontrolle mit 35,6% sehr groß war (Abbildung 16). Wie an Tag 60 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Biomasse bei Bodengehalten von 2,8 und 19,0 mg/kg TM Boden für NM-300K und der Klärschlammkontrolle. In dem höchsten Bodengehalt bei NM-300K ergab sich eine Hemmung von 41,6%, die aufgrund des großen Variationskoeffizienten in der Klärschlammkontrolle nicht statistisch signifikant war. Für  $\text{AgNO}_3$  ergab sich bei einem Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden eine Stimulation der mikrobiellen

Biomasse im Vergleich zur Klärschlammkontrolle von 35,3% (Abbildung 17). Auch diese Stimulation war, aufgrund des großen Variationskoeffizienten der Klärschlammkontrolle, nicht statistisch signifikant.

An Tag 140 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der mikrobiellen Biomasse der beiden Kontrollen. Für NM-300K zeigte sich eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung mit einer Hemmung der mikrobiellen Biomasse von 39,6% bei einem Bodengehalt von 2,8 mg/kg TM Boden, die bis auf 61,2% bei einem Bodengehalt von 46,8 mg/kg TM Boden anstieg. Für AgNO<sub>3</sub> ergab sich ebenfalls eine Hemmung (20,7%), die statistisch allerdings nicht signifikant war (Abbildung 17).

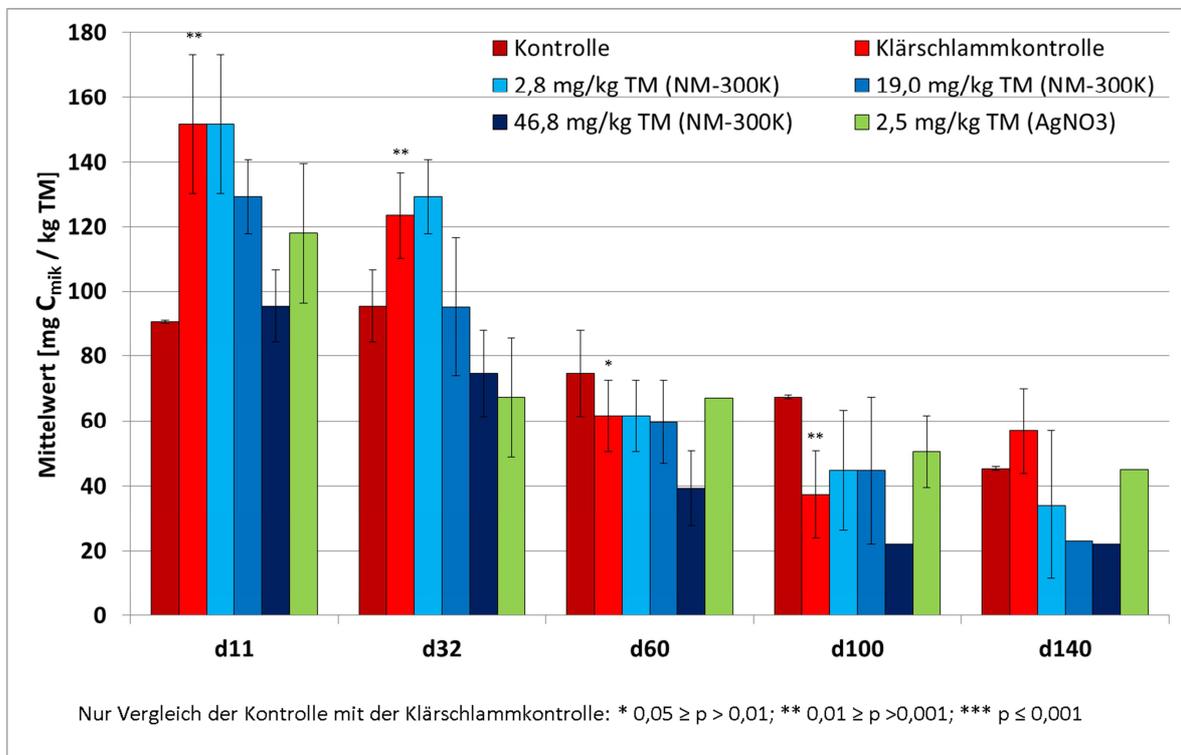


Abbildung 16: Langzeitversuch 2 – Mikrobielle Biomasse

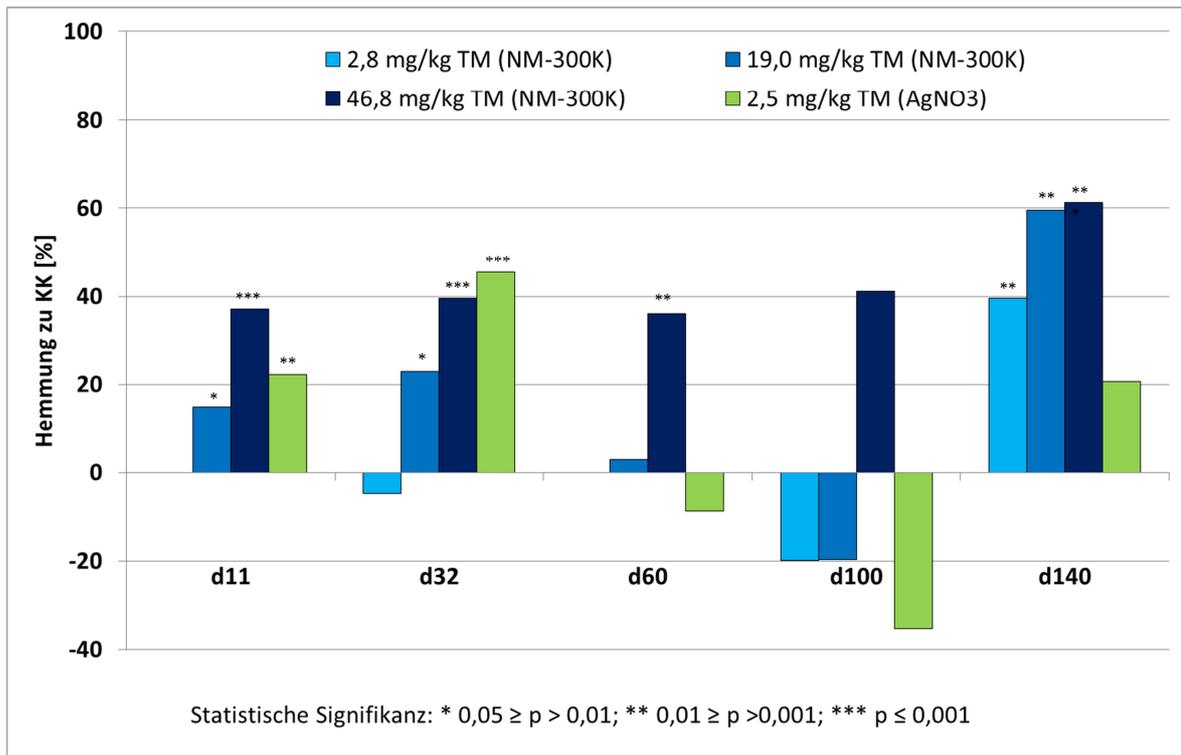


Abbildung 17: Langzeitversuch 2 - Hemmung der mikrobiellen Biomasse durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)

### 7.2.5 Basalatmung

Die Ergebnisse der Basalatmung wurden in Tabelle 71 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Entwicklung der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen und der Vergleich von Kontrolle und Klärschlammkontrolle wurde in Abbildung 18 dargestellt. Effekte hervorgerufen durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub>, wurden in Abbildung 19 dargestellt. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von ≤ 15% wurde erfüllt.

Nach 32 Tagen wurde die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen durch die Zugabe von Klärschlamm im Vergleich zur Kontrolle stimuliert. NM-300K führte in keinem der untersuchten Bodengehalte von 2,8 bis 46,8 mg/kg TM Boden zu einer Wirkung auf die Atmungsaktivität der Mikroorganismen. Bei einem Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden war die Atmungsaktivität durch AgNO<sub>3</sub> um 27,3% gehemmt (Abbildung 19). Nach 60 Tagen wurde die Atmungsaktivität der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle weiterhin stimuliert. Die Stimulation sank allerdings im Zeitraum von Tag 32 bis Tag 60 von 106,3% auf 50,0% (Abbildung 18). Schon ab

einem Bodengehalt von 2,8 mg/kg TM Boden mit NM-300K zeigte sich eine starke Hemmung auf die Atmungsaktivität von 44,4%, bis zu einer Hemmung von 55,6% bei einem Gehalt von 46,8 mg/kg TM Boden. Auch  $\text{AgNO}_3$  führte bei einem Gehalt von 2,5 mg/kg TM Boden zu einer Hemmung der Atmungsaktivität im Vergleich zur Klärschlammkontrolle von 40,7% (Abbildung 19). Die Atmungsaktivität in Kontrolle und Klärschlammkontrolle war nach 100 Tagen vergleichbar. Eine statistisch signifikante Hemmung von 33,3% wurde bei einem Bodengehalt von 46,8 mg/kg TM Boden (NM-300K) und von 66,7% bei 2,5 mg/kg TM Boden ( $\text{AgNO}_3$ ) festgestellt (Abbildung 19). In den beiden niedrigeren Bodengehalten wurde für NM-300K keine Hemmung ermittelt. Die Atmungsaktivität in Kontrolle und Klärschlammkontrolle war auch nach 140 Tagen vergleichbar. Es ergab sich für NM-300K eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung mit einer statistisch signifikanten Hemmung von 30,0% bei einem Gehalt von 2,8 mg/kg TM Boden, die bis auf 70,0% bei einem Gehalt von 46,8 mg/kg TM Boden anstieg. Auch  $\text{AgNO}_3$  bewirkte eine Verminderung der Atmungsaktivität von 50% im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (Abbildung 19).

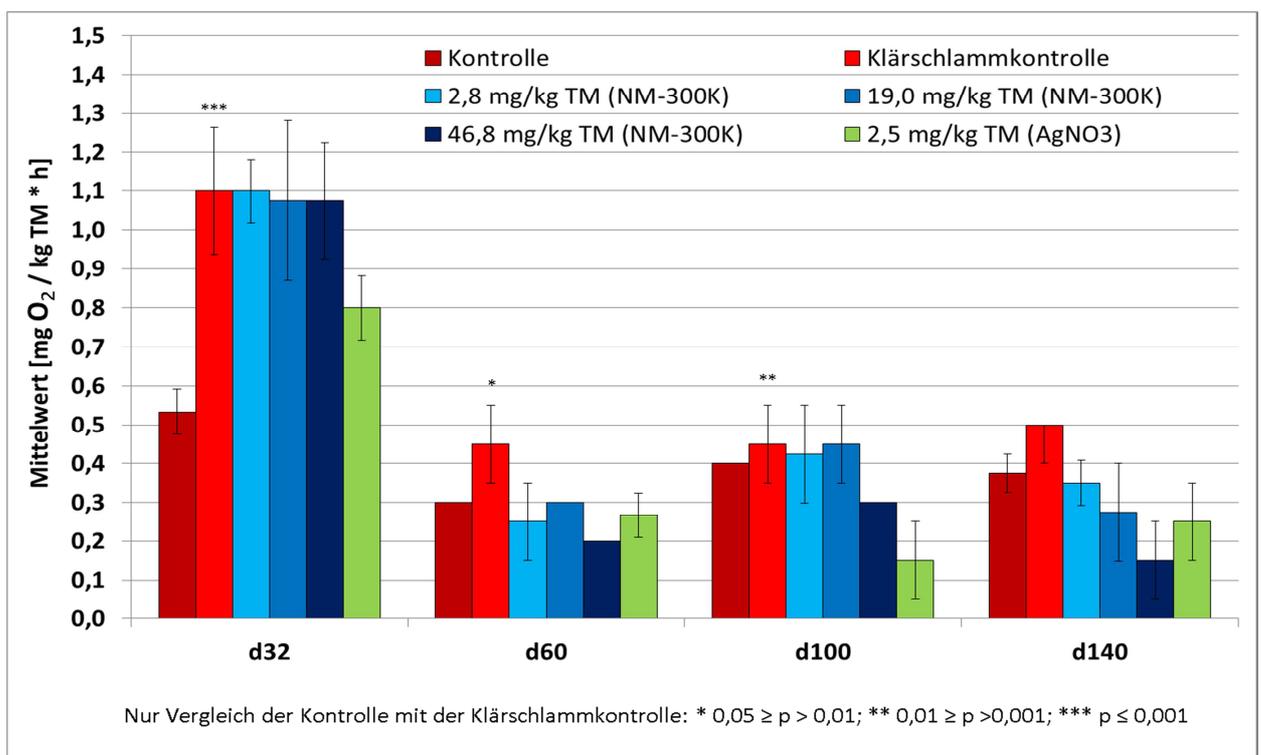
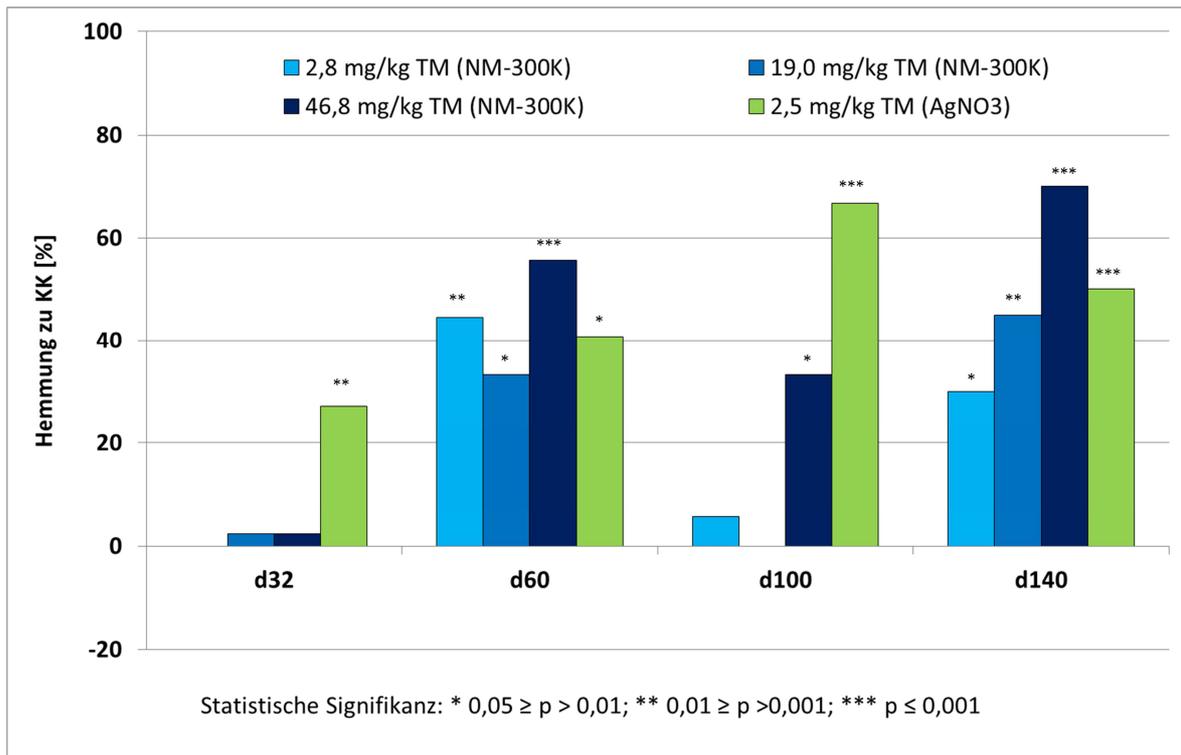


Abbildung 18: Langzeitversuch 2 – Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen



**Abbildung 19: Langzeitversuch 2 - Hemmung der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)**

### 7.2.6 Pflanzentest

Zum Ende des Versuchs nach 140 Tagen wurde mit dem Versuchsboden ein Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208 durchgeführt. Der Versuch wurde wie in Abschnitt 4.4.6 beschrieben durchgeführt. In allen Replikaten der Kontrolle waren insgesamt mehr als 70% der Samen aufgegangen und die Mortalität der aufgegangenen Keimlinge betrug weniger als 10%, womit die Validitätskriterien erfüllt wurden. Es wurden keine Nekrosen oder Chlorosen im Verlauf des Versuchs festgestellt. In Tabelle 44 sind die Ergebnisse dieses Versuchs aufgeführt.

**Tabelle 44: Langzeitversuch 2 - Pflanzentest mit *Phaseolus aureus* L., durchgeführt nach 140 Tagen Alterung des Versuchsbodens**

Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Keimrate [%]	Mortalität [%]	Frischgewicht [g/Testgefäß] ± Stabw. <sup>a</sup>	Hemmung des Wachstums im Vergleich zur Klärschlammkontrolle [%]
Kontrolle	93,3	3,6	5,467 ± 0,962	
Klärschlammkontrolle	80	4,2	5,888 ± 0,745	
<b>NM-300K</b>				
2,8	90	5,0	4,313 ± 0,770	26,7**
19,0	100	0	5,466 ± 0,882	7,2
46,8	90	0	7,528 ± 0,873	-27,9**
<b>AgNO<sub>3</sub></b>				
2,5	95	5,3	4,131 ± 0,638	29,8**

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Das Pflanzenwachstum in den Ansätzen der Kontrolle lag bei 5,467 g/Testgefäß, in denen der Klärschlammkontrolle bei 5,888 g/Testgefäß (Tabelle 44). Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied in den nur mit Klärschlamm versetzten Ansätzen auf das Pflanzenwachstum nach 140 Tagen festgestellt. In den Versuchsansätzen mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurde ein vermindertes Pflanzenwachstum bei den niedrigen Bodengehalten festgestellt, das Pflanzenwachstum wurde aber auch bei höheren Bodengehalten an NM-300K gefördert. Bei einem NM-300K Gehalt von 2,8 mg/kg TM Boden war das Pflanzenwachstum um 26,7% reduziert. Mit zunehmendem NM-300K Gehalt gleicht sich das Wachstum der Pflanzen dem der Kontrollen an (7,2% bei 19,0 mg/kg TM Boden). Letztlich wurde das Pflanzenwachstum bei einem NM-300K Gehalt von 46,8 mg/kg TM Boden sogar um 27,9% gesteigert. AgNO<sub>3</sub> führt ebenso wie NM-300K bei einem geringen Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden zu einer Hemmung des Pflanzenwachstums um 29,8% (Tabelle 44).

### 7.3 Langzeitversuch 3

Der Versuche wurde wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben durchgeführt.

#### 7.3.1 Begleitanalytik

Die Ergebnisse der pH-Wert Messung an den fünf Messzeitpunkten wurde in Tabelle 45 dargestellt. Es zeigte sich, dass der pH-Wert durch die Zugabe des gefaulten Klärschlammes nicht so stark abgesenkt wurde, wie dies bei nicht gefaultem Klärschlamm in den ersten beiden Langzeitversuchen der Fall war. Zu Versuchsbeginn wurde in den Kontrollen ein pH-Wert von 5,0 (Kontrolle) und 4,8 (Klärschlammkontrolle) gemessen. Der pH-Wert in den Replikaten mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> lag ebenfalls in diesem Bereich (Tabelle 45). Aufgrund dessen, dass der pH-Wert in der Klärschlammkontrolle und den beiden Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> vergleichbar war, wurde eine Beeinflussung der Aktivität der Mikroorganismen ausgeschlossen. Über die gesamte Versuchsdauer von 140 Tagen veränderte sich der pH-Wert nur geringfügig. Am Ende des Versuchs wurde sowohl in den Kontrollen als auch in den untersuchten Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> ein pH-Wert von 4,7 gemessen (Tabelle 45).

**Tabelle 45: Langzeitversuch 3 - Begleitanalytik (pH-Werte)**

Testgegenstand	Kontrolle	Klärschlammkontrolle	NM-300K	AgNO <sub>3</sub>
pH-Wert <sup>a</sup> (Tag 11)	5,0	4,8	4,9	4,9
pH-Wert <sup>a</sup> (Tag 32)	4,9	4,7	4,8	4,8
pH-Wert <sup>a</sup> (Tag 60)	4,9	4,7	4,8	4,8
pH-Wert <sup>a</sup> (Tag 100)	4,8	4,7	4,8	4,8
pH Wert <sup>a</sup> (Tag 140)	4,7	4,7	4,7	4,7

<sup>a</sup> in 0,01M CaCl<sub>2</sub>-Lösung

#### 7.3.2 Potentielle Ammoniumoxidation

Die Ergebnisse der Potentiellen Ammoniumoxidation wurden im Anhang in Tabelle 72 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Nitritproduktion durch die Nitrifikanten und der Vergleich von Kontrolle und Klärschlammkontrolle wurde in Abbildung 20 dargestellt. Abbildung 21 zeigt die durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufene Wirkung auf die Nitritproduktion. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von ≤ 15% wurde erfüllt.

Es zeigte sich, dass es bei der ersten Messung nach 11 Tagen auch mit gefaultem Klärschlamm zu einer Hemmung der Nitrifikanten im Boden in allen Versuchsansätzen, die Klärschlamm enthielten, kam. Dies war ebenfalls in den ersten beiden Langzeitversuchen mit nicht gefaultem Klärschlamm beobachtet worden. Der Vergleich der beiden Kontrollen ergab eine statistisch signifikante Hemmung der Nitrifikanten von 31,3% in der Klärschlammkontrolle (Abbildung 20). Der Vergleich zwischen Klärschlammkontrolle und den Versuchsansätzen mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  ergab keine signifikanten Unterschiede.

Nach 32 Tagen war die Nitritproduktion in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr gehemmt. Stattdessen wurde die Nitritproduktion in der Klärschlammkontrolle um 29,7% gesteigert. Dieser Unterschied in der Nitritproduktion war allerdings aufgrund des mit 15,7% hohen Variationskoeffizienten nicht signifikant. Die Nitritproduktion der Nitrifikanten wurde bei Bodengehalten von 2,8 mg/kg TM Boden durch NM-300K nicht gehemmt. Für  $\text{AgNO}_3$  wurde hingegen bei einem Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden eine signifikante Hemmung der Nitritproduktion festgestellt (Abbildung 21).

An Tag 60 und 100 wurden keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Replikaten der Kontrolle, Klärschlammkontrolle und den Replikaten mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  gemessen. Zum Ende des Versuchs wurde die Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle weiterhin stimuliert (36,0%). Eine durch NM-300K oder  $\text{AgNO}_3$  hervorgerufene Wirkung wurde auch nach 140 Tagen nicht festgestellt.

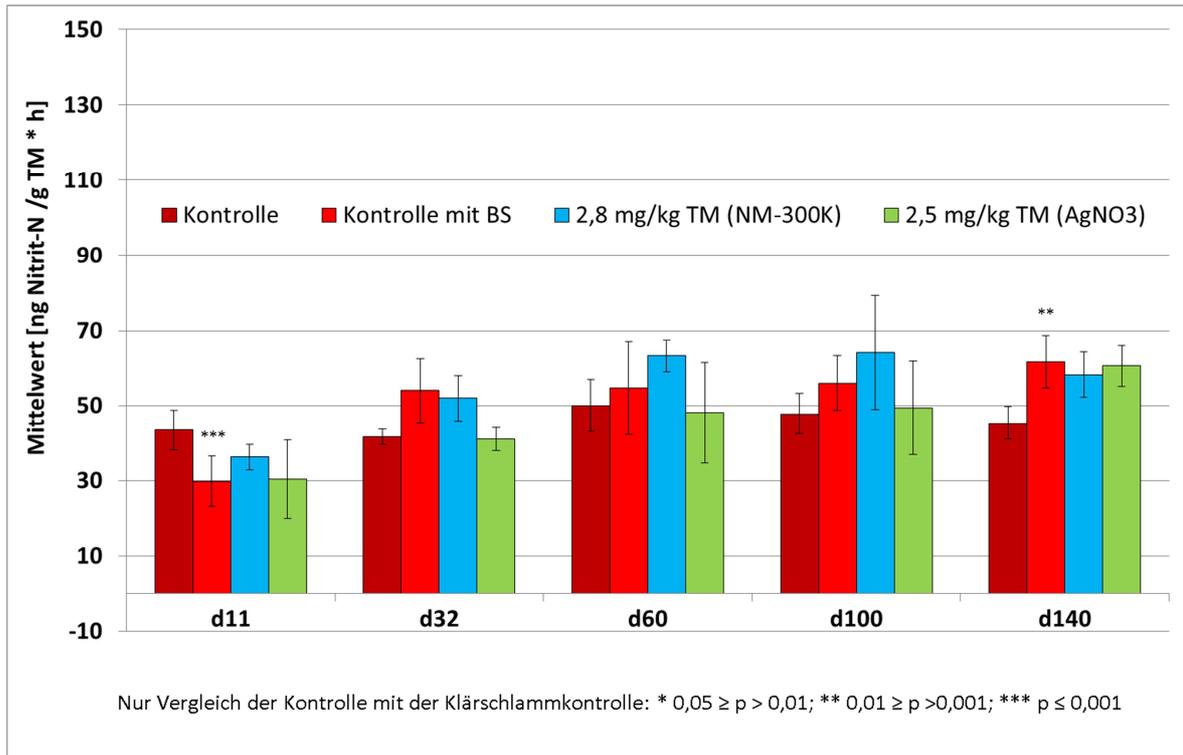


Abbildung 20: Langzeitversuch 3 – Nitritproduktion

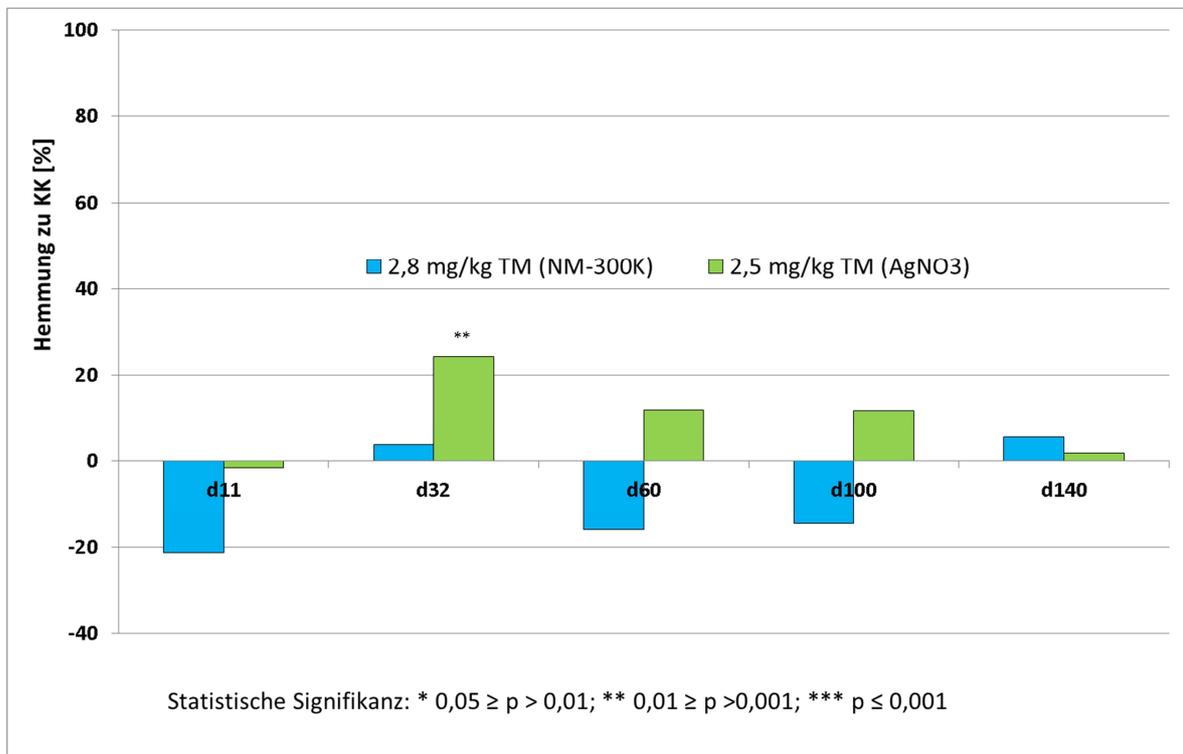


Abbildung 21: Langzeitversuch 3 - Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)

### 7.3.3 C-Transformation

Die Ergebnisse der C-Transformation wurden im Anhang in Tabelle 73 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Entwicklung der mikrobiellen Biomasse und signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Klärschlammkontrolle wurden in Abbildung 22 dargestellt. Abbildung 23 zeigt die dazugehörige durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufene Wirkung auf die mikrobielle Biomasse. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von  $\leq 15\%$  wurde erfüllt.

An Tag 11 zeigte sich, dass die mikrobielle Biomasse durch die Zugabe von Klärschlamm gefördert wurde. Im Vergleich der Kontrolle mit der Klärschlammkontrolle ergab sich eine durch den Klärschlamm hervorgerufene Stimulation der mikrobiellen Biomasse von 32,9% (Abbildung 22). Im Vergleich der Klärschlammkontrolle mit den verschiedenen Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Nach 32 Tagen war die Stimulation, die durch den Klärschlamm hervorgerufen wurde, nicht mehr signifikant. Bei einem Bodengehalt von 2,8 mg/kg TM Boden führte NM-300K zu einer Hemmung der mikrobiellen Biomasse von 21,7%. AgNO<sub>3</sub> zeigte bei 2,5 mg/kg TM Boden keine Wirkung auf die Biomasse (Abbildung 23).

An Tag 60 wurde die mikrobielle Biomasse in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle um 36,8% gehemmt (Abbildung 22). Für NM-300K und AgNO<sub>3</sub> zeigten sich keine Unterschiede zur Klärschlammkontrolle in den untersuchten Bodengehalten. Auch nach 100 Tagen ergab sich eine Hemmung der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle von 22,8%. (Abbildung 22). NM-300K führte bei einem Bodengehalt von 2,8 mg/kg TM Boden zu keiner Wirkung auf die mikrobielle Biomasse. Bei einem Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden kam es durch AgNO<sub>3</sub> zu einer Hemmung von 43,3% im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (Abbildung 23).

Nach 140 Tagen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kontrollen gemessen werden. Auch die Replikate mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> führten zu keinem statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Klärschlammkontrolle.

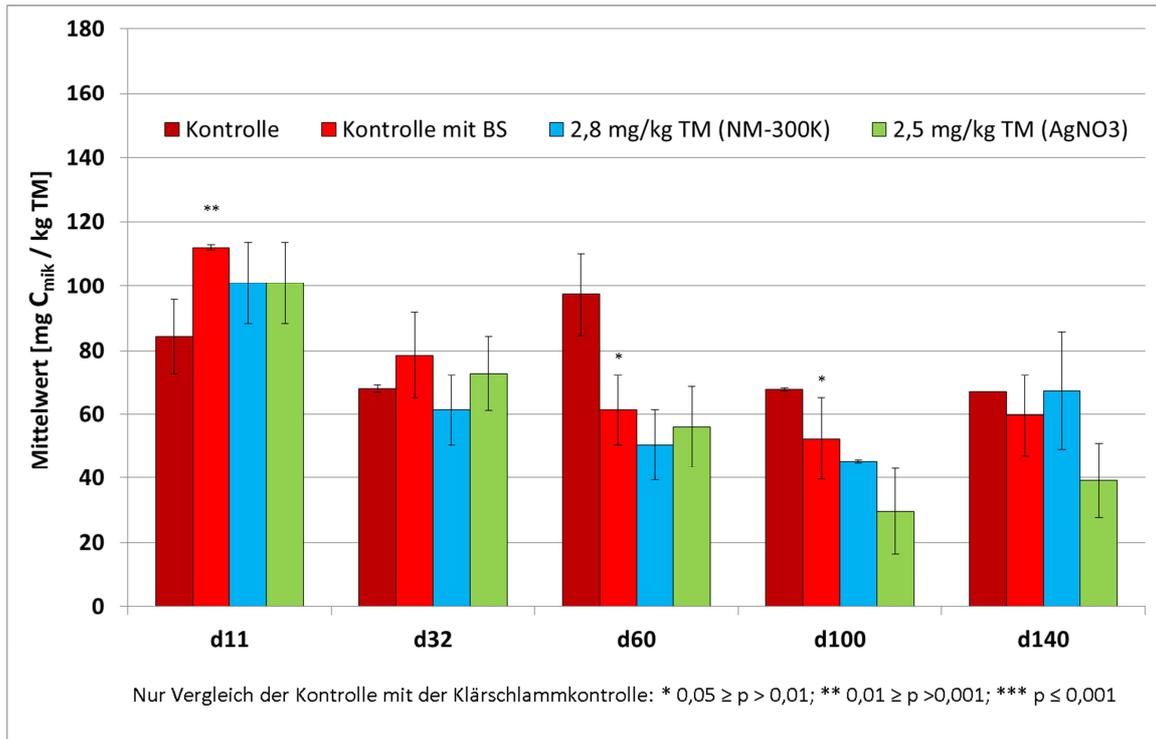


Abbildung 22: Langzeitversuch 3 – Mikrobielle Biomasse

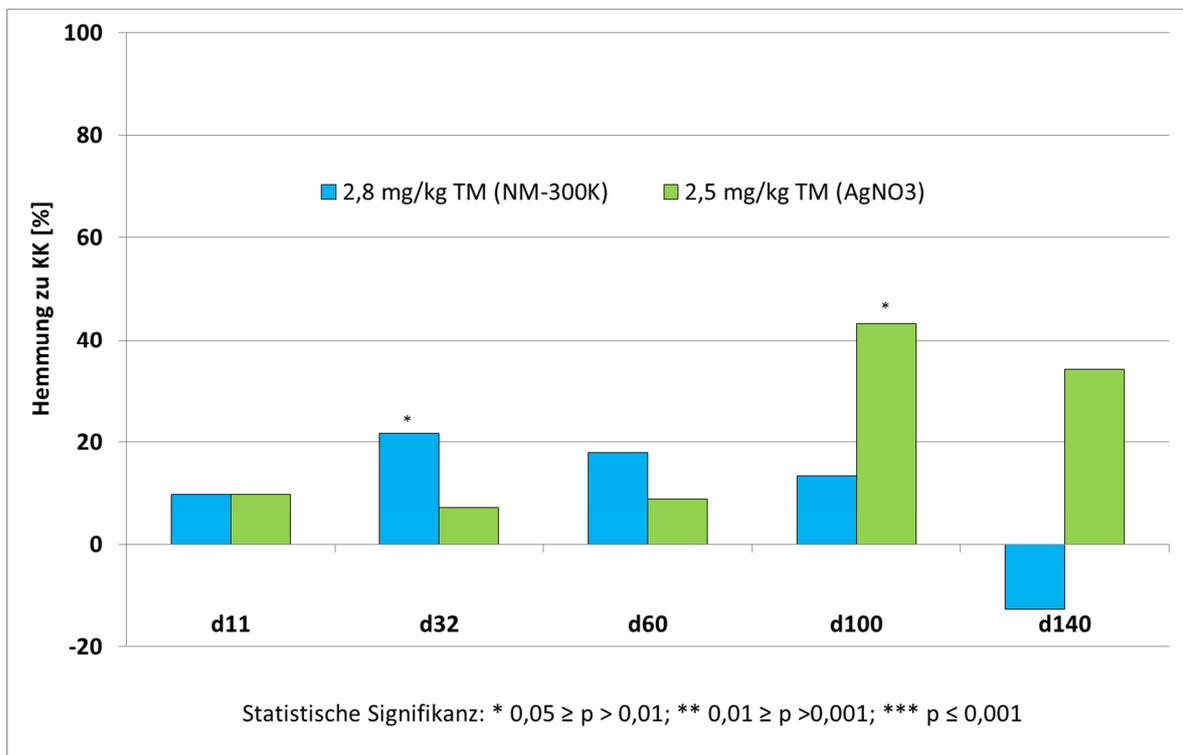


Abbildung 23: Langzeitversuch 3 - Hemmung der mikrobiellen Biomasse durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)

### 7.3.4 Basalatmung

Die Ergebnisse der Basalatmung wurden im Anhang in Tabelle 74 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Entwicklung der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen und signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Klärschlammkontrolle wurden in Abbildung 24 dargestellt. Abbildung 25 zeigt die dazugehörige, durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufene, Wirkung auf die Atmungsaktivität der Mikroorganismen. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von  $\leq 15\%$  wurde erfüllt.

Nach 32 Tagen zeigte sich, dass durch die Zugabe von Klärschlamm die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle um 25,0% gehemmt war (Abbildung 24). In den Versuchsansätzen mit NM-300K ergab sich im Vergleich zur Klärschlammkontrolle eine Stimulation von 25,0% bei einem Bodengehalt von 2,8 mg/kg TM Boden (Abbildung 25). AgNO<sub>3</sub> zeigte bei einem Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden keine Wirkung auf die Atmungsaktivität der Mikroorganismen.

Nach 60 und 100 Tagen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Atmungsaktivitäten der Kontrollen und zwischen der Klärschlammkontrolle und den Replikaten mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> gemessen. Auch am Versuchsende nach 140 Tagen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in diesem Versuch.

Im Gegensatz zu den bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Versuchen wurde keine Stimulation der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen durch die Zugabe von Klärschlamm festgestellt. Das ist ein Hinweis darauf, dass alle leicht verfügbaren Kohlenstoffquellen abgebaut wurden, womit belegt wurde, dass die Faulung vor Versuchsbeginn funktioniert hat.

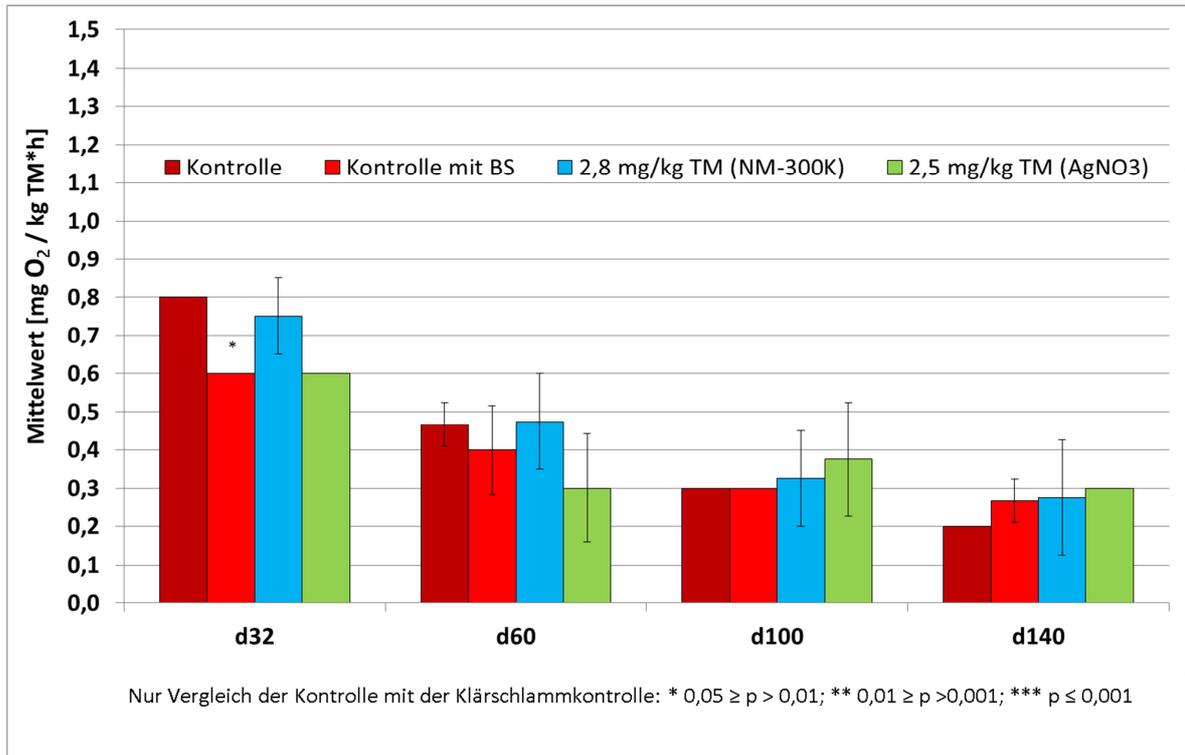


Abbildung 24: Langzeitversuch 3 - Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen

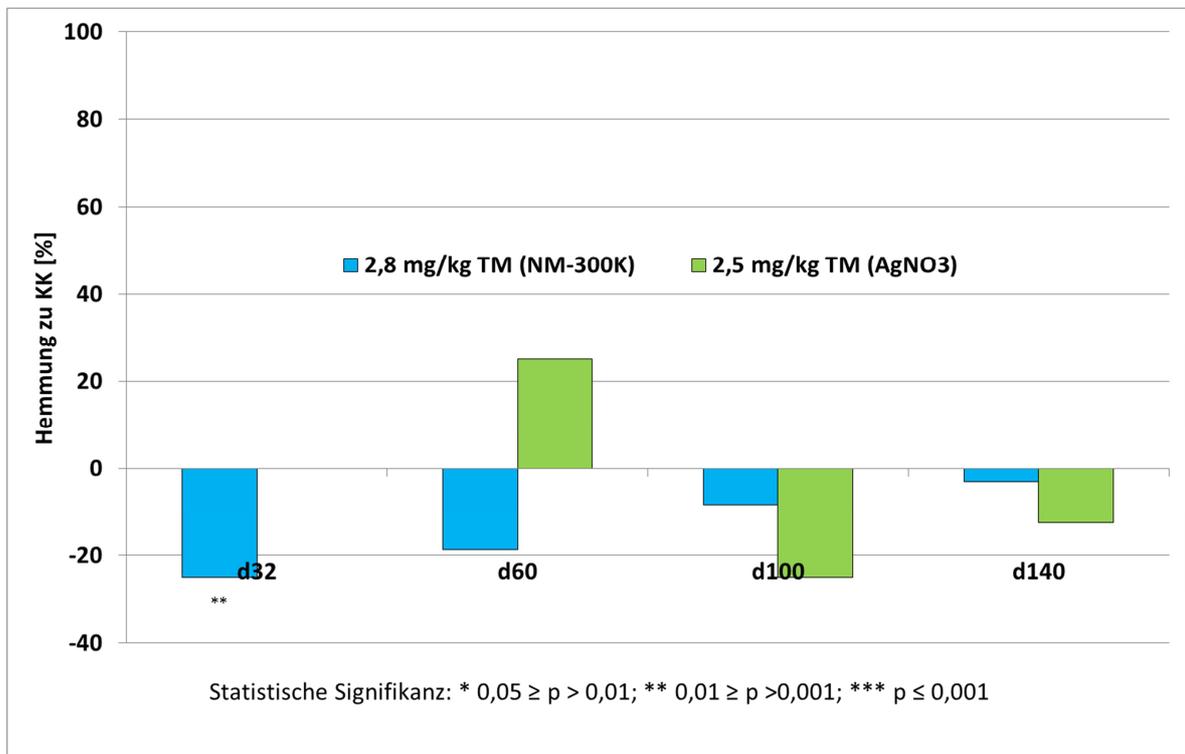


Abbildung 25: Langzeitversuch 3 - Hemmung der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)

## 7.4 Langzeitversuch 4

Der Versuche wurde wie in Kapitel 4.5.4 beschrieben durchgeführt.

### 7.4.1 Kläranlagensimulation

Die Applikation von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  wurde in diesem Langzeitversuch mit Hilfe einer Kläranlagensimulation über 10 Tage vorgenommen. In Tabelle 46 sind die Messungen des Ag-Gehaltes in Ein- und Auslaufproben über den Zeitraum der Zugabe von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  in die Kläranlagen wiedergegeben. Die verschiedenen Parameter der Begleitanalytik (pH-Werte, TS-Gehalte und Wasserchemie) zu den jeweiligen Kläranlagen wurden in Tabelle 75 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Einzelwerte der DOC-Elimination im Verlauf der Kläranlagensimulation sind in Tabelle 76 (Kapitel 13.2, Anhang) aufgeführt und in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

Die Messungen des Ag-Gehaltes zeigen, dass bei allen Einlaufkonzentrationen über einen Zeitraum von 10 Tagen der Großteil an NM-300K im Klärschlamm wiederzufinden war. Bei der höchsten Einlaufkonzentration von 1,6 mg/L wurden zwischen 82 und 100% an NM-300K im Klärschlamm lokalisiert. Für eine Zugabe von 0,4 mg/L an  $\text{AgNO}_3$  zeigte sich, dass zwischen 87 und 100% des Silbers im Klärschlamm verblieben (Tabelle 46). Innerhalb der Vorlaufphase lag die Elimination des DOC in allen Anlagen bei einem Wert von  $\geq 80\%$ , so dass nach drei Tagen Stammsuspension in die Anlagen eingeleitet wurde. In allen sechs Anlagen wurde über den gesamten Versuchszeitraum eine DOC-Elimination von 95 bis 98% ermittelt (Abbildung 26). Die Abbauleistung des DOC durch die Mikroorganismen des Klärschlammes wurde durch keine, der in die Kläranlagen eingeleiteten Konzentrationen an NM-300K oder  $\text{AgNO}_3$ , beeinflusst. Bei Betrachtung der Kläranlagen, in die NM-300K bzw.  $\text{AgNO}_3$  dosiert wurde, konnte wie in den ersten beiden Kläranlagensimulationen (siehe 5.8) eine zunehmende Dunkelfärbung des Klärschlammes beobachtet werden.

Tabelle 46: Langzeitversuch 4 - Bilanzierung des Verbleibs von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> in der Kläranlage

Versuchstag	Ag-Gehalt des Einlaufs [mg/L]	Ag-Gehalt des Auslaufs [mg/L]	Prozentualer Anteil Ag an Klärschlamm [%]
<b>Anlage 1: Kontrolle</b>			
D0	< NG	< NG	n.b.
D10	< NG	< NG	n.b.
<b>Anlage 2: 0,04 mg/L (NM-300K)</b>			
D0	0,0251	< NG	100,0
D4	0,0256	< NG	100,0
D8	0,0248	0,0009	96,4
D10	0,0186	< NG	100,0
<b>Anlage 3: 0,4 mg/L (NM-300K)</b>			
D0	0,2016	< NG	100,0
D4	0,2714	0,0201	92,6
D8	0,3166	0,0189	94,0
D10	0,288	0,0268	90,7
<b>Anlage 4: 0,8 mg/L (NM-300K)</b>			
D4	0,2953	0,0374	87,3
D10	0,4108	0,0600	85,4
<b>Anlage 5: 1,6 mg/L (NM-300K)</b>			
D0	1,1450	0,0008	99,9
D4	1,3248	0,0745	94,4
D8	1,1498	0,2114	81,6
D10	1,1235	0,2005	82,2
<b>Anlage 6: 0,4 mg/L (AgNO<sub>3</sub>)</b>			
D0	0,2564	0,0000	100,0
D4	0,2959	0,0035	98,8
D8	0,2108	0,0060	97,2
D10	0,1921	0,0243	87,3

NG: Nachweisgrenze; n.b.: nicht bestimmt

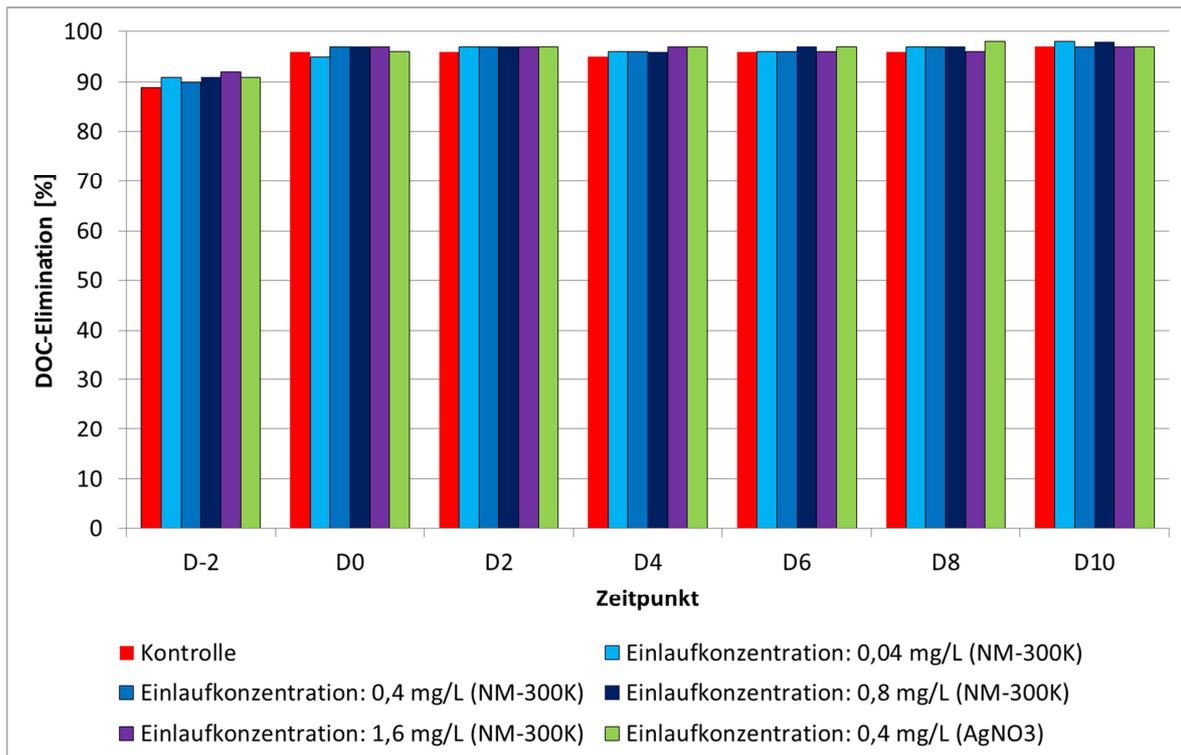


Abbildung 26: Langzeitversuch 4 - DOC-Elimination bei Kläranlagensimulation

#### 7.4.2 Begleitanalytik in Boden

In Tabelle 47 sind die Mittelwerte aus den Messungen der Silbergehalte im Boden zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgeführt. Für NM-300K wurden Bodengehalte von 0,3 / 2,5 / 5,2 / und 9,0 mg/kg TM Boden gemessen, für AgNO<sub>3</sub> lagen der Ag-Gehalt im Boden bei 3,4 mg/kg TM Boden. Die Standardabweichung war in allen Ansätzen gering (Tabelle 47). Die gemessenen Bodengehalte entsprechen zwischen 56 und 85% dessen, was als Zielgehalt an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Boden vorgesehen war. Die Zielgehalte wurden mit der Annahme eines konstanten TS-Gehaltes und einer Sorption von Ag an den Klärschlamm von 100% berechnet. In 7.4.1 zeigt sich aber, dass, gerade bei hohen Einlaufkonzentrationen, zwischen 80 und 100% an Silber in Klärschlamm verbleiben, wodurch die Abweichungen der gemessenen Bodengehalte von den Zielgehalten erklärbar sind.

Der pH-Wert wurde in diesem Versuch durch die Zugabe von Klärschlamm in das Testsystem abgesenkt. Zu Versuchsbeginn wurde in den Kontrollen mit und ohne Klärschlamm ein pH-Wert von 4,9 gemessen. Der pH-Wert mit verschiedenen Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> lag ebenfalls in diesem Bereich

(Tabelle 47). Aufgrund dessen, dass der pH-Wert in Klärschlammkontrolle und den Replikaten mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> vergleichbar war, wurde eine Beeinflussung der Aktivität der Mikroorganismen ausgeschlossen. Mit zunehmender Versuchsdauer nahm der pH-Wert in den Kontrollen und bei den verschiedenen Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> ab, wobei die Abnahme des pH-Wertes in den Replikaten mit Klärschlamm (z.B. Klärschlammkontrolle: pH 4,9 an Tag 11; pH 4,3 an Tag 140) im Vergleich zur Kontrolle (pH 4,9 an Tag 11; pH 4,7 an Tag 140) geringfügig stärker war. Nach 140 Tagen wurden pH-Werte von 4,7 in der Kontrolle und 4,2 bis 4,3 in allen Replikaten mit Klärschlamm gemessen (Tabelle 47).

**Tabelle 47: Langzeitversuch 4 - Begleitanalytik (Ag-Gehalt; pH-Werte)**

Testgegenstand	Kontrolle	KK <sup>a</sup>	NM-300K				AgNO <sub>3</sub>
Gemessener Bodengehalt <sup>b</sup> [mg/kg TM Boden] ± Stabw. <sup>c</sup>	0	0	0,3 ± 0,02	2,5 ± 0,2	5,2 ± 0,5	9,0 ± 0,8	3,4 ± 0,2
pH-Wert <sup>d</sup> (Tag 11)	4,9	4,9	4,9	5,0	5,0	5,0	4,9
pH-Wert <sup>d</sup> (Tag 32)	4,9	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
pH-Wert <sup>d</sup> (Tag 60)	4,7	4,4	4,3	4,4	4,4	4,3	4,3
pH-Wert <sup>d</sup> (Tag 100)	4,7	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
pH Wert <sup>d</sup> (Tag 180)	4,7	4,3	4,2	4,3	4,2	4,3	4,2

<sup>a</sup> Klärschlammkontrolle; <sup>b</sup> Mittelwert aus n=12 Proben; <sup>c</sup> Standardabweichung; <sup>d</sup> in 0,01M CaCl<sub>2</sub>-Lösung

### 7.4.3 Potentielle Ammoniumoxidation

Die Ergebnisse der Potentiellen Ammoniumoxidation an den fünf Messzeitpunkten über 140 Tage wurden im Anhang in Tabelle 77 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Nitritproduktion durch die Nitrifikanten und statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Klärschlammkontrolle wurden in Abbildung 27 dargestellt. Abbildung 28 zeigt die dazugehörige, durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufene, Wirkung auf die Nitritproduktion. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von ≤ 15% wurde erfüllt.

Es zeigte sich, dass es nach 11 Tagen zu einer sehr starken Hemmung der Nitrifikanten im Boden in allen Versuchsansätzen, die Klärschlamm enthielten, kam.

Dies war ebenfalls in den vorherigen Langzeitversuchen beobachtet worden, wobei in Langzeitversuch 4 die Hemmung am stärksten ausfiel. Der Vergleich der beiden Kontrollen ergab eine statistisch signifikante Hemmung der Nitrifikanten von 96,1% in der Klärschlammkontrolle (Abbildung 27). Die Unterschiede im Vergleich zwischen Klärschlammkontrolle und den Ansätzen mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  waren nicht signifikant. In Abbildung 28 wurde, die Hemmung die an Tag 11 im Vergleich mit der Klärschlammkontrolle auftrat, nicht mit aufgetragen. Aufgrund des hohen Variationskoeffizienten und der sehr geringen Messwerte wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt.

Nach 32 Tagen wurde die Nitritproduktion in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle um 28,8% gefördert (Abbildung 27). Die Nitritproduktion der Nitrifikanten wurde bei Bodengehalten von 9,0 mg/kg TM für NM-300K und 3,4 mg/kg TM Boden für  $\text{AgNO}_3$  um 24,6% und 39,0% gehemmt. In den Bodengehalten an NM-300K unterhalb von 9,0 mg/kg TM Boden kam es zu keiner signifikanten Wirkung auf die Nitrifikanten (Abbildung 28).

An Tag 60 wurden vergleichbare Werte für die Nitritproduktion in der Kontrolle und der Klärschlammkontrolle gemessen. Die Nitritproduktion wurde bei Bodengehalten von 0,3 und 2,5 mg/kg TM nicht durch NM-300K beeinflusst. Bei den beiden Bodengehalten darüber (5,2 und 9,0 mg/kg TM Boden) wurde die Nitritproduktion von NM-300K um 16,0 und 57,6% gehemmt (Abbildung 28). Unter Berücksichtigung der statistisch nicht signifikanten Hemmungen in den beiden niedrigen Bodengehalten an NM-300K ist auf eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung zu schließen.  $\text{AgNO}_3$  führte bei einem Bodengehalt von 3,4 mg/kg TM Boden zu einer Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten von 38,0% (Abbildung 28).

An Tag 100 ergab sich ein vergleichbares Bild zu Tag 60. In den Kontrollen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Nitritproduktion der Nitrifikanten. Lediglich die Hemmung fiel in den beiden Bodengehalten in denen eine Wirkung verzeichnet wurde stärker aus, als dies an Tag 60 der Fall war. In den beiden Bodengehalten an NM-300K von 0,3 und 2,5 mg/kg TM wurde die Nitritproduktion weiterhin nicht gehemmt. Bei einem Bodengehalt von 9,0 mg/kg TM Boden wurden die Nitrifikanten durch NM-300K um 71,3% am stärksten gehemmt. Auch die Hemmung der Nitritproduktion durch  $\text{AgNO}_3$  steigerte sich von 38,0% an Tag 60 auf 62,1% an Tag 100 (Abbildung 28).

Nach 140 Tagen wurden die Nitrifikanten in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle um 61,9% gehemmt (Abbildung 27). Es zeigte sich eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung für NM-300K. Bei einem Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM wurde die Nitritproduktion der Nitrifikanten um 53,8% gehemmt. Aufgrund des hohen Variationskoeffizienten war dieser Unterschied zur Klärschlammkontrolle allerdings nicht statistisch signifikant. Die Hemmung steigerte sich auf einen Wert von 97,3% Hemmung bei einem Bodengehalt von 5,2 mg/kg TM Boden und 100% Hemmung bei einem Bodengehalt von 9,0 mg/kg TM Boden. Die Wirkung von  $\text{AgNO}_3$  auf die Nitrifikanten steigerte sich auf 88,0% an Tag 140 (Abbildung 28).

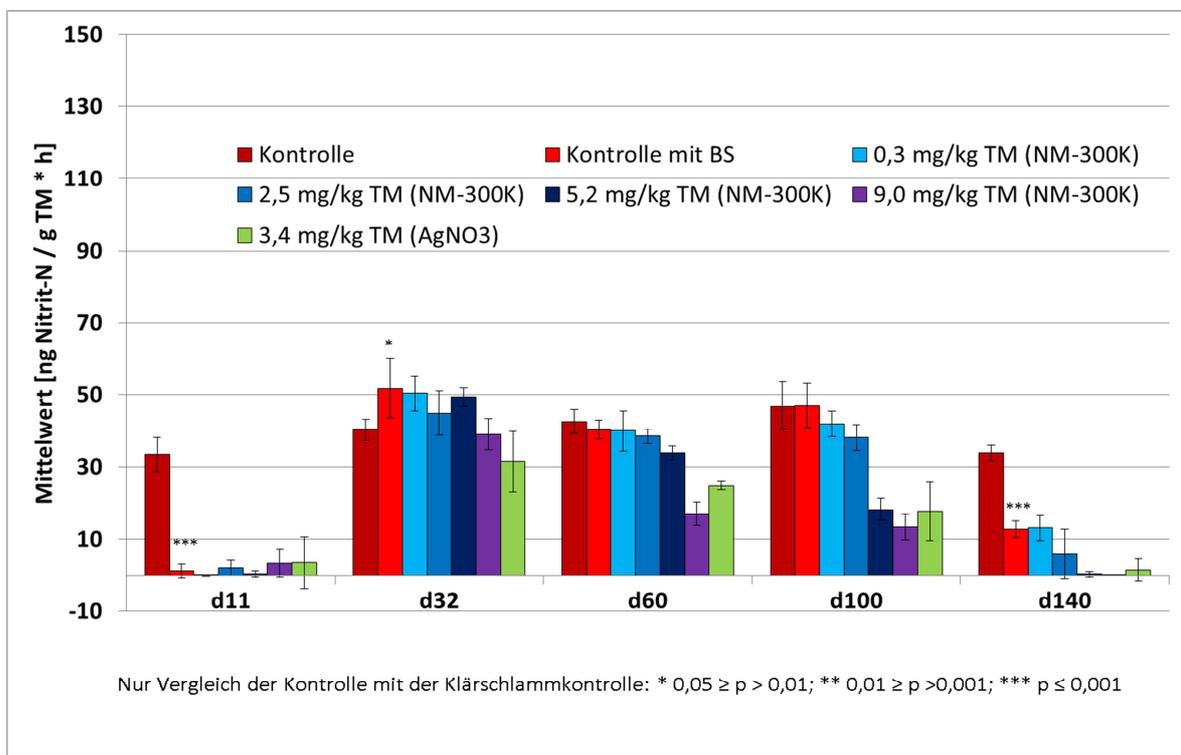


Abbildung 27: Langzeitversuch 4 - Nitritproduktion

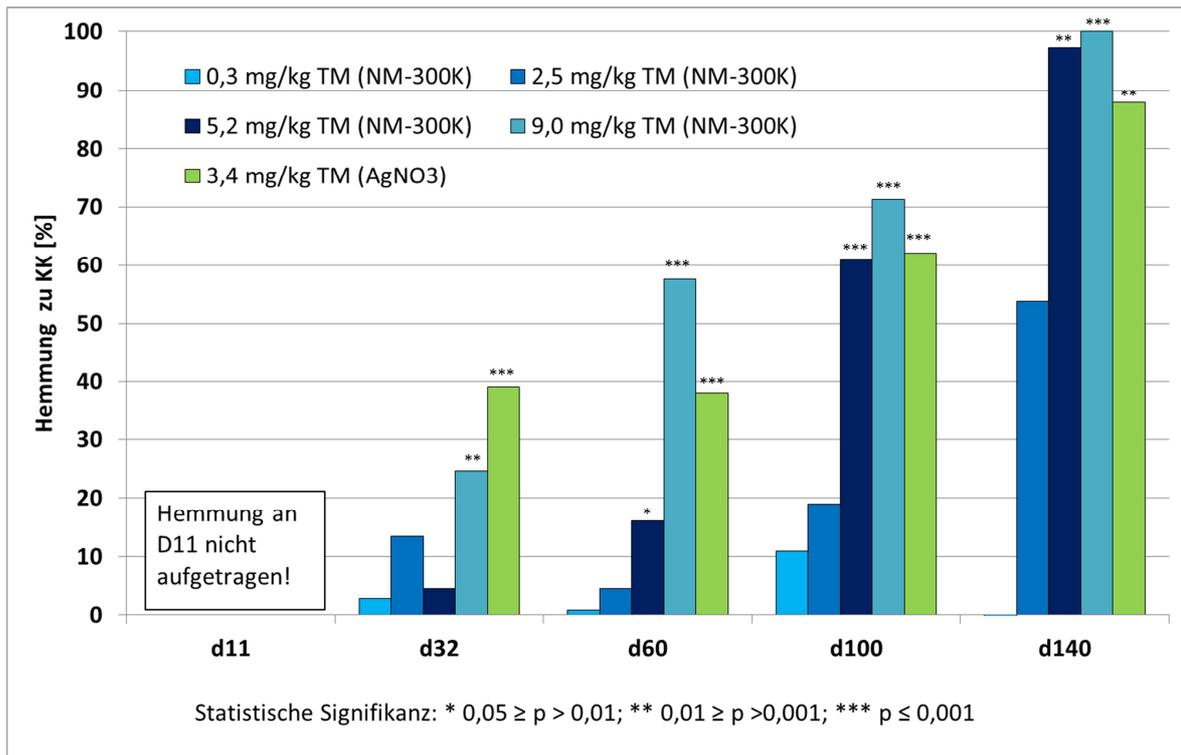


Abbildung 28: Langzeitversuch 4 - Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)

#### 7.4.4 C-Transformation

Die Ergebnisse der C-Transformation an fünf Messzeitpunkten über 140 Tage wurden im Anhang in Tabelle 78 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die mikrobiellen Biomasse und statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Klärschlammkontrolle wurden in Abbildung 29 dargestellt. In Abbildung 30 werden die dazugehörigen aufgetretenen Effekte auf die mikrobielle Biomasse gezeigt. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von  $\leq 15\%$  wurde erfüllt.

An Tag 11 zeigte sich, dass die mikrobielle Biomasse durch die Zugabe von Klärschlamm gefördert wurde. Im Vergleich der Kontrolle mit der Klärschlammkontrolle ergab sich eine durch den Klärschlamm hervorgerufene Stimulation der mikrobiellen Biomasse von 67,7% (Abbildung 29). Im Vergleich der Klärschlammkontrolle mit den verschiedenen Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> ergaben sich ausschließlich Stimulationen, die nicht statistisch signifikant waren.

Nach 32 Tagen war die Stimulation in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle auf 17,8% gesunken (Abbildung 29). Bei Bodengehalten an NM-300K von 0,3 und 2,5 mg/kg TM Boden kam es zu signifikanten Unterschieden im Vergleich zur Klärschlammkontrolle. Die mikrobielle Biomasse wurde hierbei um 15,1 und 20,0% gehemmt (Abbildung 30). In den höheren Bodengehalten und für AgNO<sub>3</sub> ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

An Tag 60 war die mikrobielle Biomasse in Kontrolle und Klärschlammkontrolle vergleichbar. Für NM-300K zeigte sich eine schwache Gehalts-Wirkungs-Beziehung mit einer Hemmung der mikrobiellen Biomasse von 25,2% bei 2,5 mg/kg TM Boden, die auf 50,0% bei 9,0 mg/kg TM Boden anstieg. Auch durch AgNO<sub>3</sub> wurde die mikrobielle Biomasse bei einem Bodengehalt von 3,4 mg/kg TM Boden um 43,3% gesenkt (Abbildung 30).

Auch an Tag 100 ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Klärschlammkontrolle. Bei Bodengehalten von 0,3 und 2,5 mg/kg TM Boden wurden keine signifikanten Unterschiede zur Klärschlammkontrolle gemessen. Diese ergaben sich aber bei Bodengehalten an NM-300K von 5,2 und 9,0 mg/kg TM Boden und lagen bei 52,0 und 64,4% Hemmung (Abbildung 30). Für AgNO<sub>3</sub> konnte, anders als an Tag 60, keine signifikante Hemmung der mikrobiellen Biomasse mehr gemessen werden.

Wie schon an Tag 60 und 100 ergab sich auch an Tag 140 kein signifikanter Unterschied zwischen der mikrobiellen Biomasse in Kontrolle und Klärschlammkontrolle. Auch in den Replikaten mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurde unabhängig vom Bodengehalt keine Wirkung auf die mikrobielle Biomasse mehr festgestellt.

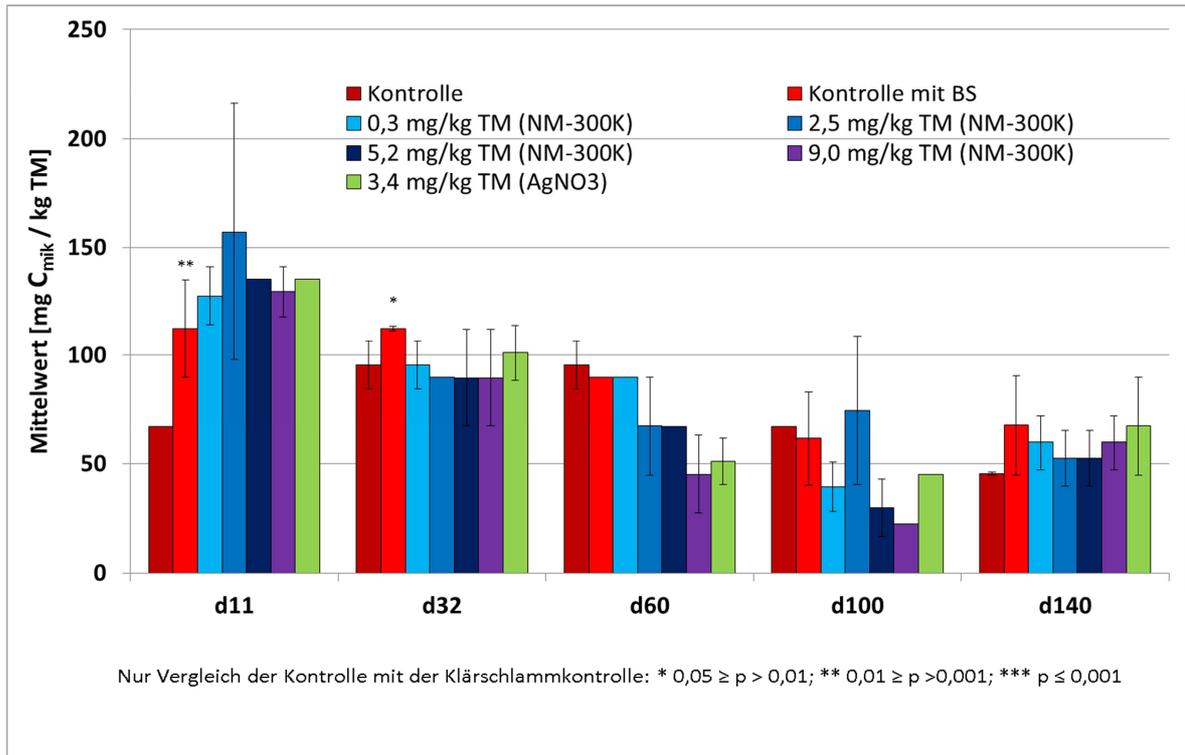


Abbildung 29: Langzeitversuch 4 - Mikrobielle Biomasse

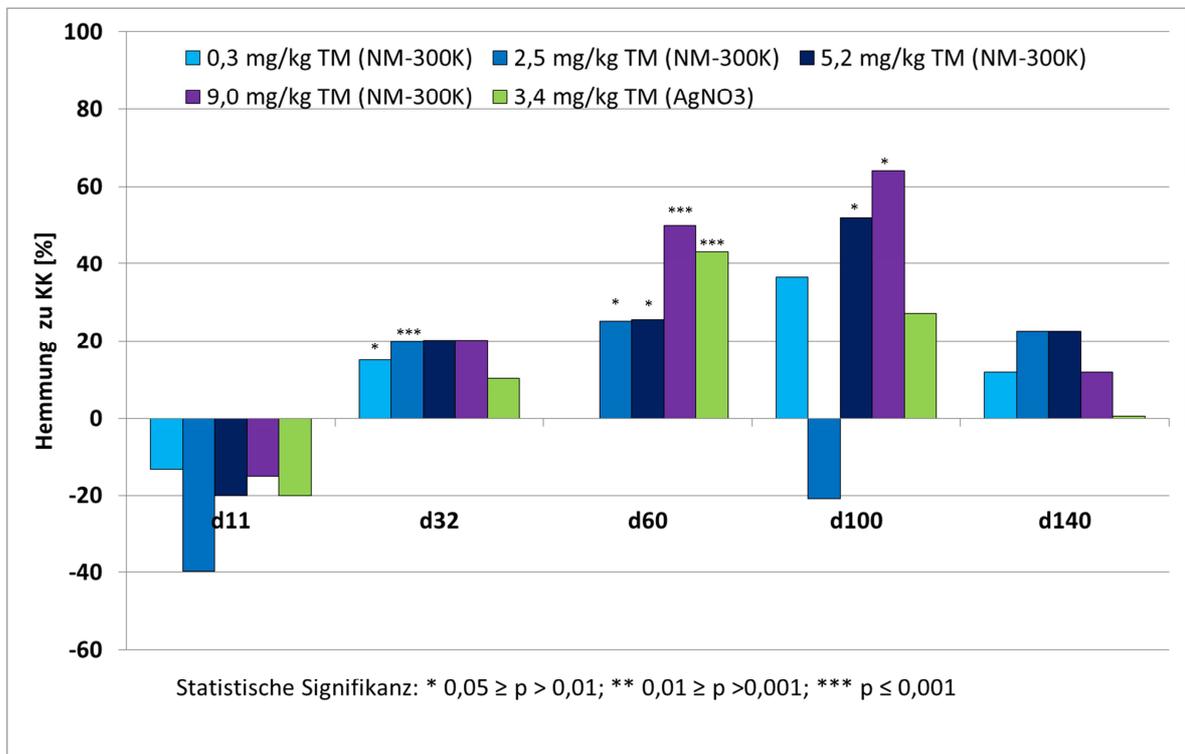


Abbildung 30: Langzeitversuch 4 - Hemmung der mikrobiellen Biomasse durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)

#### 7.4.5 Basalatmung

Die Ergebnisse der Basalatmung wurden im Anhang in Tabelle 79 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Entwicklung der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen und signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen wurden in Abbildung 31 dargestellt. Abbildung 32 zeigt die dazugehörige durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufene, Wirkung auf die Atmungsaktivität der Mikroorganismen. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von  $\leq 15\%$  wurde erfüllt.

Die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen wurde an Tag 11 durch die Zugabe von Klärschlamm in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle um 148,9% gesteigert (Abbildung 31). NM-300K und AgNO<sub>3</sub> führten in keinem der untersuchten Bodengehalte zu einer Wirkung auf die Atmungsaktivität der Mikroorganismen. Dies war auch nach 32 Tagen der Fall. Lediglich die Stimulation der Atmungsaktivität im Vergleich der beiden Kontrollen hatte abgenommen und lag nun bei 70,6% (Abbildung 31).

Nach 60 Tagen wurde die Atmungsaktivität der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle um 88,9% gesteigert (Abbildung 31). NM-300K führte ab einem Bodengehalt von 2,5 mg/kg TM Boden zu einer Hemmung der Atmungsaktivität von 16,7%, die auf 29,2% bei einem Bodengehalt von 5,2 mg/kg TM Boden und 27,8% bei 9,0 mg/kg TM Boden anstieg (Abbildung 32). AgNO<sub>3</sub> zeigte keine Wirkung auf die Atmungsaktivität bei einem Gehalt von 3,4 mg/kg TM Boden.

Zu den Messzeitpunkten 100 und 140 wurden weder zwischen den Kontrollen noch zwischen Klärschlammkontrolle und den untersuchten Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> statistisch signifikante Unterschiede gemessen.

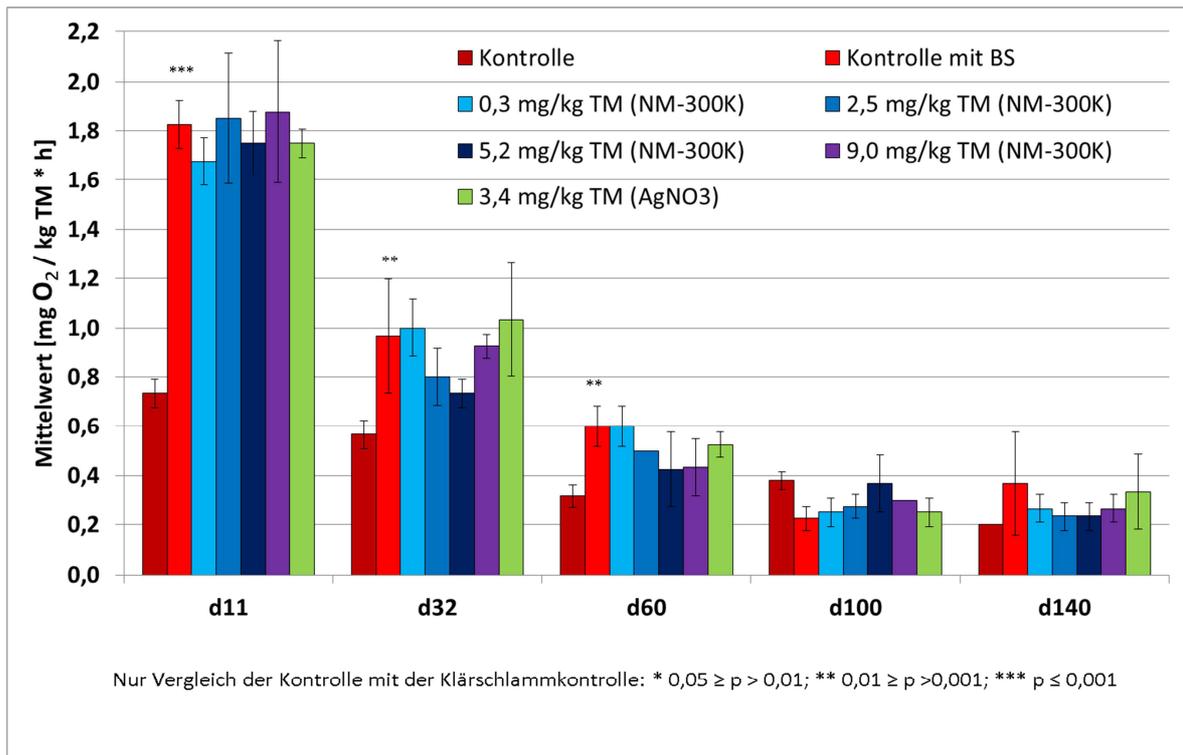


Abbildung 31: Langzeitversuch 4 - Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen

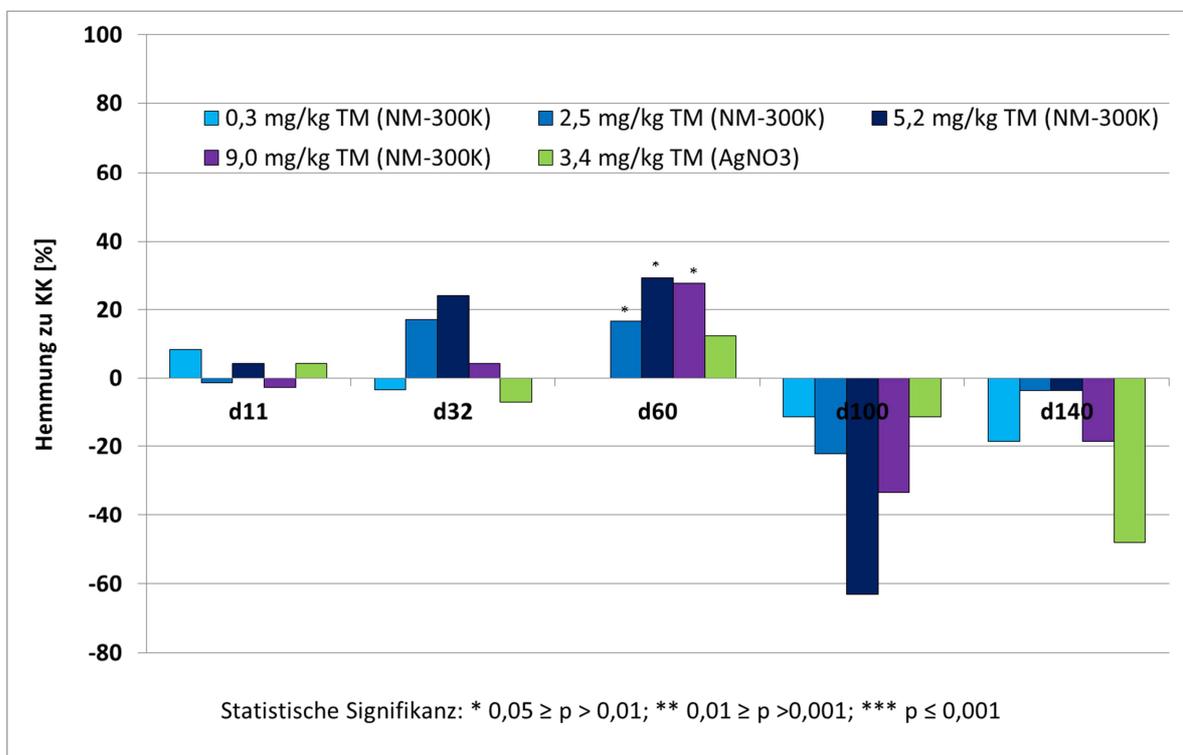


Abbildung 32: Langzeitversuch 4 - Hemmung der Atmungsaktivität durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle

#### 7.4.6 Mikrobielle Bodendiversität

An Tag 60 und 100 wurde die mikrobielle Bodendiversität betrachtet. Sechs fluorogene Substrate, die stellvertretend für einen bestimmten Abbauprozess von Makromolekülen standen, wurden untersucht. Die Ergebnisse der mikrobiellen Bodendiversität sind in Tabelle 80 (Kapitel 13.2, Anhang) aufgeführt. Die Hemmung der Enzymaktivität wurde in Abbildung 33 (Tag 60) und Abbildung 34 (Tag 100) dargestellt.

An Tag 60 wurde die Hydrolyse von Phosphatestern durch NM-300K bei Bodengehalten von 2,5 bis 9,0 mg/kg TM Boden signifikant gehemmt, was durch den verminderten Abbau des Substrates 4-MUF-phosphat belegt wurde. Für  $\text{AgNO}_3$  war keine Wirkung auf die Hydrolyse von Phosphatestern zu ermitteln. Bei einem Bodengehalt von 5,2 und 9,0 mg/kg TM Boden (NM-300K) wurde der Abbau von L-Alanin-AMC und somit die Hydrolyse von Oligopeptiden signifikant vermindert. Auch der Abbau der Substrate L-Leucin-AMC wurde bei 9,0 mg/kg TM Boden gehemmt. Einem Bodengehalt an  $\text{AgNO}_3$  von 3,4 mg/kg TM Boden rief nur eine Hemmung des Abbaus von L-Alanin-AMC hervor.

An Tag 100 zeigte sich, dass der Abbau von 4-MUF- $\beta$ -D-glucopyranosid mit steigendem Gehalt an NM-300K und auch in dem Ansatz mit  $\text{AgNO}_3$  zunahm. Der Abbau des Substrates bis-(4-MUF)-phosphat wird hingegen in Abhängigkeit des Bodengehaltes an NM-300K gehemmt. NM-300K beeinflusst also die Hydrolyse von Phosphatdiestern nach 100 Tagen. Bei dem Abbau von 4-MUF-phosphat zeigen sich vergleichbare Werte wie an Tag 60. Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Klärschlammkontrolle ist hier allerdings nur bei einem Bodengehalt an NM-300K von 9,0 mg/kg TM Boden gegeben. Auch nach 100 Tagen wird weiterhin der Abbau von L-Leucin-AMC und L-Alanin-AMC durch NM-300K gehemmt. Vor allem der Abbau von L-Alanin-AMC wurde mit steigendem Bodengehalt an NM-300K stärker gehemmt. Die Hydrolyse von Oligopeptiden (Aminosäuren) wurde somit auch nach 100 Tagen noch stark durch NM-300K beeinflusst. Im Gegensatz dazu ergab sich für  $\text{AgNO}_3$  bei einem Bodengehalt von 3,4 mg/kg TM Boden eine Stimulation des Abbaus von L-Leucin-AMC (signifikant) und L-Alanin-AMC (nicht signifikant).

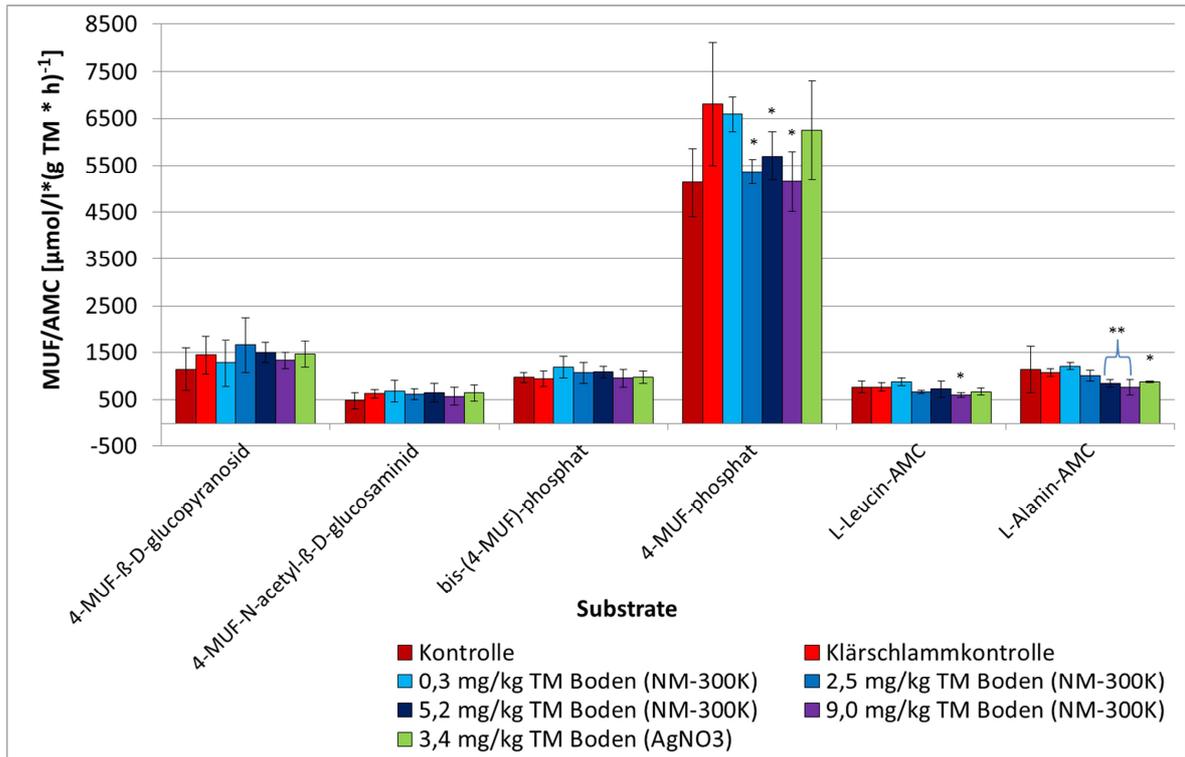


Abbildung 33: Langzeitversuch 4 - Enzymaktivität von Bodenmikroorganismen nach 60 Tagen

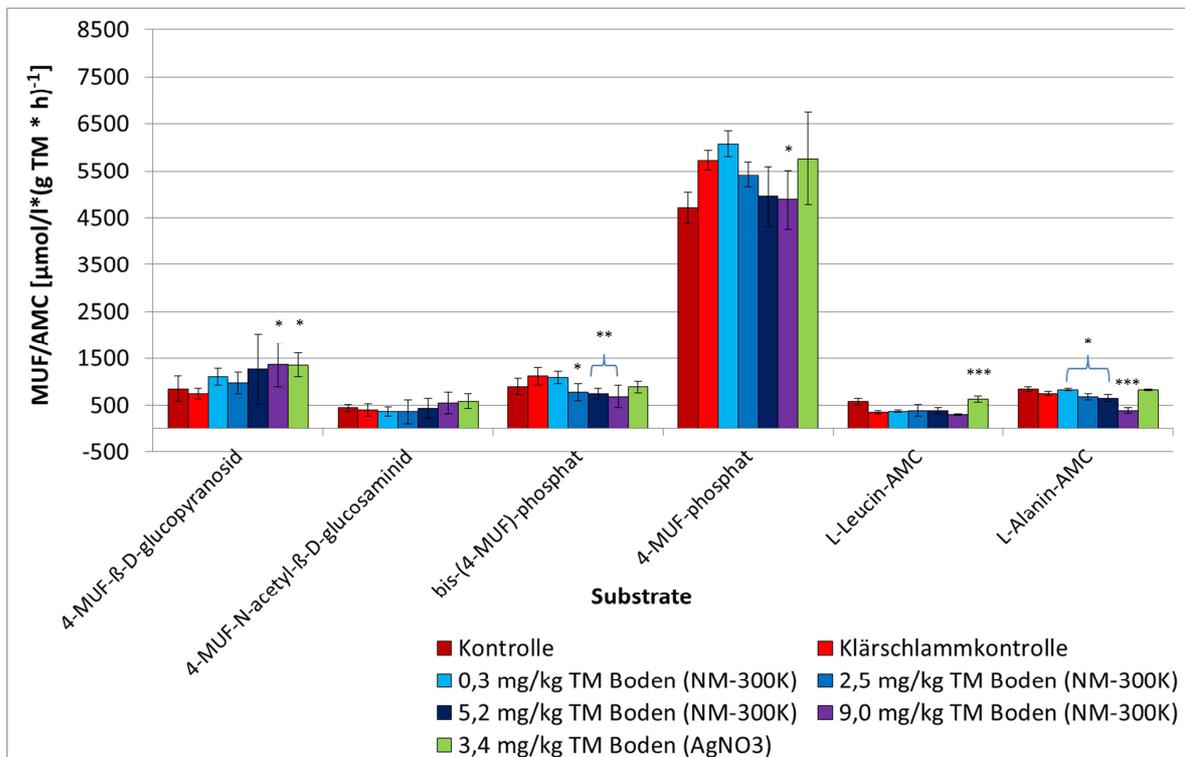


Abbildung 34: Langzeitversuch 4 - Enzymaktivität von Bodenmikroorganismen nach 100 Tagen

#### 7.4.7 Pflanzentest

In diesem Langzeitversuch wurde nach 32 und 100 Tagen mit dem Versuchsboden ein Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208 durchgeführt. Der Versuch wurde wie in Abschnitt 4.4.6 durchgeführt. In allen Replikaten der Kontrolle waren insgesamt mehr als 70% der Samen aufgegangen und die Mortalität der aufgegangenen Keimlinge betrug weniger als 10%, womit die Validitätskriterien erfüllt wurden. Es wurden keine Nekrosen oder Chlorosen im Verlauf des Versuchs festgestellt. In Tabelle 48 wurden die Ergebnisse dieses Versuchs aufgeführt.

An Tag 32 wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Pflanzenwachstum der Kontrolle und der Klärschlammkontrolle festgestellt, womit der Klärschlamm weder eine hemmende noch eine stimulierende Wirkung auf das Pflanzenwachstum nach 32 Tagen hatte. In den Replikaten mit NM-300K wurden ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede des Pflanzenwachstums im Vergleich zur Klärschlammkontrolle vorgefunden. Ein vermindertes Pflanzenwachstum wurde hingegen bei einem Bodengehalt an  $\text{AgNO}_3$  von 3,4 mg/kg TM Boden vorgefunden. Hier wurde das Pflanzenwachstum im Vergleich zur Klärschlammkontrolle um 46,0% gehemmt (Tabelle 48). Nach 100 Tagen zeigte sich ein verändertes Bild in dem durchgeführten Pflanzentest. Das Pflanzenwachstum war im Vergleich zu Tag 32 insgesamt über 14 Tage wesentlich schwächer ausgeprägt. Die Klärschlammkontrolle wies eine Stimulation des Pflanzenwachstums im Vergleich zur Kontrolle auf, die statistisch signifikant war. Der Vergleich der Klärschlammkontrolle mit den vier untersuchten Bodengehalten an NM-300K zeigte eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung, hervorgerufen durch NM-300K. Bei einem Bodengehalt von 0,3 und 2,5 mg/kg TM Boden ergaben sich Hemmungen von 6,6 und 16,4%, die allerdings keine Signifikanz aufwiesen.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden hingegen bei Bodengehalten von 5,2 und 9,0 mg/kg TM Boden vorgefunden. Hier war das Pflanzenwachstum um 20,0 und 33,6% gehemmt. Auch durch  $\text{AgNO}_3$  wurde das Pflanzenwachstum gehemmt. Die Hemmung lag mit 29,6% hierbei in einem vergleichbaren Bereich wie an Tag 32 (Tabelle 48).

**Tabelle 48: Langzeitversuch 4 - Pflanzentest mit *Phaseolus aureus* L. nach 32 Tagen und 100 Tagen Alterung**

	Bodengehalt [mg/kg TM Boden]	Keimrate [%]	Mortalität [%]	Frischgewicht [g/Testgefäß] ± Stabw. <sup>a</sup>	Hemmung des Wachstums im Vergleich zur KK [%]
<b>D32</b>	Kontrolle (K)	96,7	0	5,878 ± 1,017	-
	Klärschlammkontrolle (KK)	86,7	0	6,358 ± 2,128	-
	0,3 (NM-300K)	93,3	0	6,561 ± 0,580	-3,2
	2,5 (NM-300K)	76,7	0	6,236 ± 1,144	1,9
	5,2 (NM-300K)	80,0	0	5,340 ± 1,251	16,0
	9,0 (NM-300K)	86,7	0	5,138 ± 0,513	19,2
	3,4 (AgNO <sub>3</sub> )	70,0	0	3,781 ± 1,333	46,0*
<b>D100</b>	Kontrolle (K)	83,3	0	3,005 ± 0,587	-
	Klärschlammkontrolle (KK)	76,7	0	4,267 ± 0,940	-
	0,3 (NM-300K)	83,3	0	3,987 ± 1,100	6,6
	2,5 (NM-300K)	83,3	0	3,567 ± 0,859	16,4
	5,2 (NM-300K)	93,3	0	3,415 ± 0,385	20,0*
	9,0 (NM-300K)	93,3	0	2,821 ± 0,572	33,9**
	3,4 (AgNO <sub>3</sub> )	66,7	0	3,005 ± 0,832	29,6**

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

## 7.5 Langzeitversuch 5

Im ersten Langzeitversuch (Kapitel 7.1) hatten sich starke Hemmungen der Nitrifikanten mit Gehalts-Wirkungs-Beziehungen an Tag 100 und Tag 180 gezeigt und die Hemmung war mit zunehmender Versuchsdauer stärker geworden. Auch die mikrobielle Biomasse war ab Tag 60 bis Tag 180 mit zunehmender Versuchsdauer stärker gehemmt worden, hier zeigten sich allerdings keine Gehalts-Wirkungs-Beziehungen. In Langzeitversuch 5 sollten die Ergebnisse des ersten Langzeitversuchs validiert werden. Der Versuch wurde wie unter 4.5.1 beschrieben angesetzt.

### 7.5.1 Begleitanalytik

Tabelle 49 sind die Mittelwerte aus den Messungen des Silbergehaltes im Boden zu den verschiedenen Zeitpunkten zu entnehmen. Für NM-300K wurden Ag-Gehalt im

Boden von 1,4 und 3,1 mg/kg TM Boden gemessen, für AgNO<sub>3</sub> lagen die Ag-Gehalte im Boden bei 2,9 und 4,1 mg/kg TM Boden. Die Standardabweichungen waren in allen Ansätzen sehr hoch (Tabelle 49). Die Messwerte des Ag-Gehaltes im Boden sind vergleichbar mit denen aus dem ersten Langzeitversuch, die für NM-300K bei 1,6 und 3,4 mg/kg TM Boden und für AgNO<sub>3</sub> bei 2,1 und 4,0 mg/kg TM Boden gelegen hatten (siehe 7.1.1).

Die Ergebnisse der pH-Wert Messungen wurden in Tabelle 49 dargestellt. An Tag 11 wurde ein pH-Wert von 4,8 sowohl in der Kontrolle als auch in der Klärschlammkontrolle gemessen. Am Ende des Versuchs war der pH-Wert in der Kontrolle nahezu gleich geblieben (pH 4,7), während er in der Klärschlammkontrolle minimal auf einen pH von 4,5 gesunken war (Tabelle 49). Eine vergleichbare Veränderung des pH-Wertes war auch bei den beiden Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> zu verzeichnen. Bei NM-300K sank der pH-Wert bei einem Bodengehalt von 3,1 mg/kg TM Boden von 4,9 auf 4,4 und bei AgNO<sub>3</sub> bei einem Bodengehalt von 2,9 mg/kg TM Boden von 4,8 auf 4,5 (Tabelle 49).

Auch die Veränderung des pH-Wertes im Boden ist vergleichbar mit der, die in Langzeitversuch 1 über 180 Tage beobachtet wurde. Ein Effekt, hervorgerufen durch eine Veränderung des pH-Wertes kann durch die minimalen Veränderungen ausgeschlossen werden.

**Tabelle 49: Langzeitversuch 5 - Begleitanalytik (pH und Bestimmung der Ag-Gehalte)**

Testgegenstand	Kontrolle	Klärschlammkontrolle	NM-300K	NM-300K	AgNO <sub>3</sub>	AgNO <sub>3</sub>
Gemessener Bodengehalt <sup>a</sup> [mg/kg TM Boden] ± Stabw. <sup>b</sup>	0	0	1,4 ± 1,1	3,1 ± 1,5	2,9 ± 1,4	4,1 ± 0,9
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 11)	4,8	4,8	4,8	4,9	4,8	4,7
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 32)	4,7	4,6	4,6	4,6	4,6	4,7
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 60)	4,8	4,6	4,6	4,6	4,6	4,5
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 100)	4,6	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
pH-Wert <sup>c</sup> (Tag 180)	4,7	4,5	4,4	4,4	4,5	4,5

<sup>a</sup> Mittelwert aus n=12 Proben; <sup>b</sup> Standardabweichung; <sup>c</sup> in 0,01M CaCl<sub>2</sub>-Lösung

### 7.5.2 Potentielle Ammoniumoxidation

Die Ergebnisse der Potentiellen Ammoniumoxidation an den fünf Messzeitpunkten über 140 Tage wurden im Anhang in Tabelle 81 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Nitritproduktion der Nitrifikanten und signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen wurden in Abbildung 35 dargestellt. Abbildung 36 zeigt die dazugehörige, durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufene, Wirkung auf die Nitritproduktion. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von  $\leq 15\%$  wurde zu allen Messzeitpunkten erfüllt.

Es zeigte sich, dass es bei der ersten Messung nach 11 Tagen zu einer Hemmung der Nitrifikanten in allen Replikaten, die Klärschlamm enthielten, kam. Im Vergleich der beiden Kontrollen ergab sich eine Hemmung der Nitritproduktion von 18,3% in der Klärschlammkontrolle (Abbildung 35). NM-300K und AgNO<sub>3</sub> führten bei einem Vergleich mit der Klärschlammkontrolle zu keiner signifikanten Hemmung der Nitrifikanten (Abbildung 36).

In den Messungen der Nitritproduktion durch die Nitrifikanten nach 32 und 60 Tagen zeigte sich ein anderes Bild. Im Vergleich der Kontrollen wurden die Nitrifikanten durch den Zusatz von Klärschlamm an Tag 32 um 19,0% und an Tag 60 um 25,2% stimuliert (Abbildung 35). In den Replikaten mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurden Nitritwerte auf Kontrollniveau gemessen. Lediglich an Tag 32 wurde eine signifikante Reduzierung der Nitritproduktion von 16,7% bei einem Bodengehalt an NM-300K von 1,4 mg/kg TM Boden ermittelt (Abbildung 36). Nach 60 Tagen war diese Hemmung nicht mehr zu messen.

Nach 100 Tagen zeigte sich keine Stimulation der Nitritproduktion der Nitrifikanten mehr. Die Nitritwerte in Kontrolle und Klärschlammkontrolle waren vergleichbar. Statistisch signifikante Unterschiede zur Klärschlammkontrolle konnten sowohl in den Replikaten mit NM-300K als auch mit AgNO<sub>3</sub> gemessen werden. Bei den Replikaten mit NM-300K ergaben sich für einen Bodengehalt von 3,1 mg/kg TM Boden eine statistisch signifikante Hemmung von 35,1%. Eine vergleichbare Toxizität ergab sich für AgNO<sub>3</sub> bei einem Bodengehalt von 4,1 mg/kg TM Boden. Hier wurde die Nitritbildung um 49,3% gehemmt (Abbildung 36).

Der Vergleich der Kontrollen nach 140 Tagen zeigte, dass die Nitritbildung in der Klärschlammkontrolle um 38,0% im Vergleich zur Kontrolle gehemmt wurde (Abbildung 35). In den Replikaten mit NM-300K wurde keine Wirkung auf die Nitrifikanten festgestellt. Bei  $\text{AgNO}_3$  verstärkte sich die Hemmung, die an Tag 100 festgestellt worden war. Für einen Bodengehalt von 4,1 mg/kg TM Boden ergab sich nun eine Hemmung von 71,1% (Abbildung 36).

Im Vergleich mit Langzeitversuch 1 zeigt sich, dass die Hemmungen, die in Versuch 5 beobachtet wurden, mit denen von Versuch 1 vergleichbar sind. Lediglich an Tag 140 unterschieden sich die Ergebnisse für NM-300K stark von denen aus Versuch 1. Die Nitritproduktion der Nitrifikanten war in Versuch 1 über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet stärker als in Versuch 5.

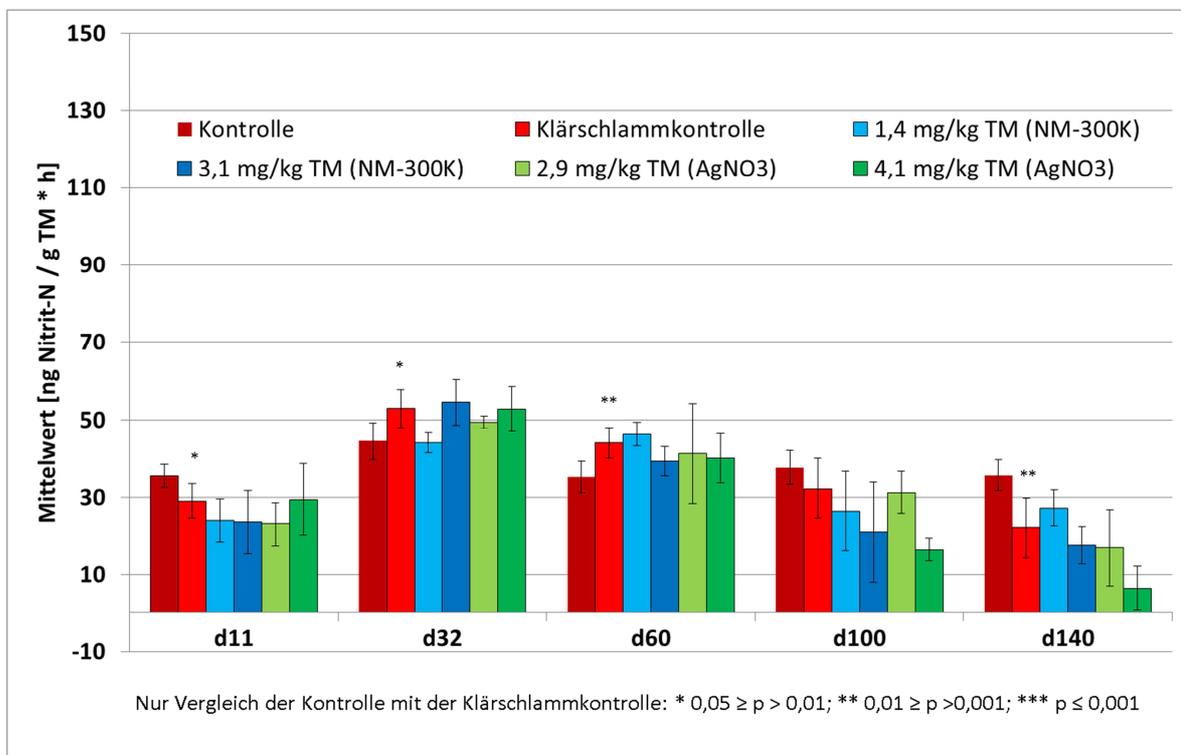
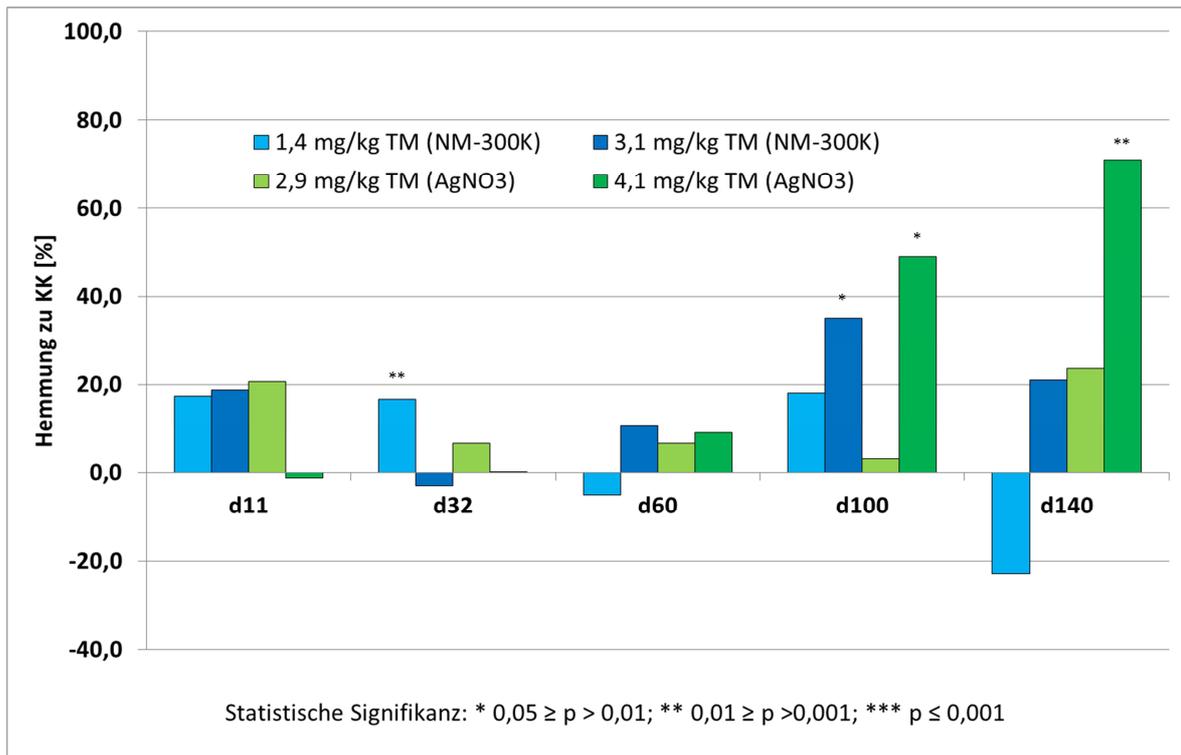


Abbildung 35: Langzeitversuch 5 - Nitritproduktion



**Abbildung 36: Langzeitversuch 5 - Hemmung der Nitritproduktion der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)**

### 7.5.3 C-Transformation

Die Ergebnisse der C-Transformation wurden im Anhang in Tabelle 82 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die mikrobielle Biomasse und statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen wurden in Abbildung 37 dargestellt. Abbildung 38 zeigt die dazugehörige, durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufene, Wirkung auf die mikrobielle Biomasse. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von ≤ 15% wurde zu allen Messzeitpunkten erfüllt.

An Tag 11 zeigte sich, dass die mikrobielle Biomasse durch die Zugabe von Klärschlamm gefördert wurde. Im Vergleich der Kontrolle mit der Klärschlammkontrolle ergab sich eine, durch den Klärschlamm hervorgerufene, Stimulation der mikrobiellen Biomasse von 52,2% (Abbildung 37). Die mikrobielle Biomasse in den Replikaten mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurde im Vergleich mit der Klärschlammkontrolle ebenfalls stimuliert.

Nach 32 Tagen wurde die mikrobielle Biomasse nach wie vor durch den Klärschlamm gefördert. In den Replikaten mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der mikrobiellen Biomasse im Vergleich zur Klärschlammkontrolle. Nach 60 und 100 Tagen wurden vergleichbare Werte für die mikrobielle Biomasse in Kontrolle und Klärschlammkontrolle gemessen. NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  zeigten bei keinem Bodengehalt eine Wirkung auf die mikrobielle Biomasse.

An Tag 140 war die mikrobielle Biomasse in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle um 20,9% gehemmt (Abbildung 37). NM-300K hatte weiterhin keine Wirkung auf die mikrobielle Biomasse. Für  $\text{AgNO}_3$  wurde eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung festgestellt. Bei einem Bodengehalt von 2,9 mg/kg TM Boden wurde die mikrobielle Biomasse im Vergleich zur Klärschlammkontrolle um 17,8% vermindert, bei einem Bodengehalt von 4,1 mg/kg TM Boden um 29,8% (Abbildung 38).

Im Vergleich zu Langzeitversuch 1 zeigt sich, dass die Hemmung vom Verlauf her vergleichbar mit Versuch 5 ist. An Tag 11 wurde in Versuch 5 eine signifikante Stimulation der mikrobiellen Biomasse festgestellt. Im Anschluss war keine Wirkung mehr festzustellen. An Tag 140 wurde eine Hemmung der mikrobiellen Biomasse gemessen, die mit Tag 100 aus Versuch 1 vergleichbar war.

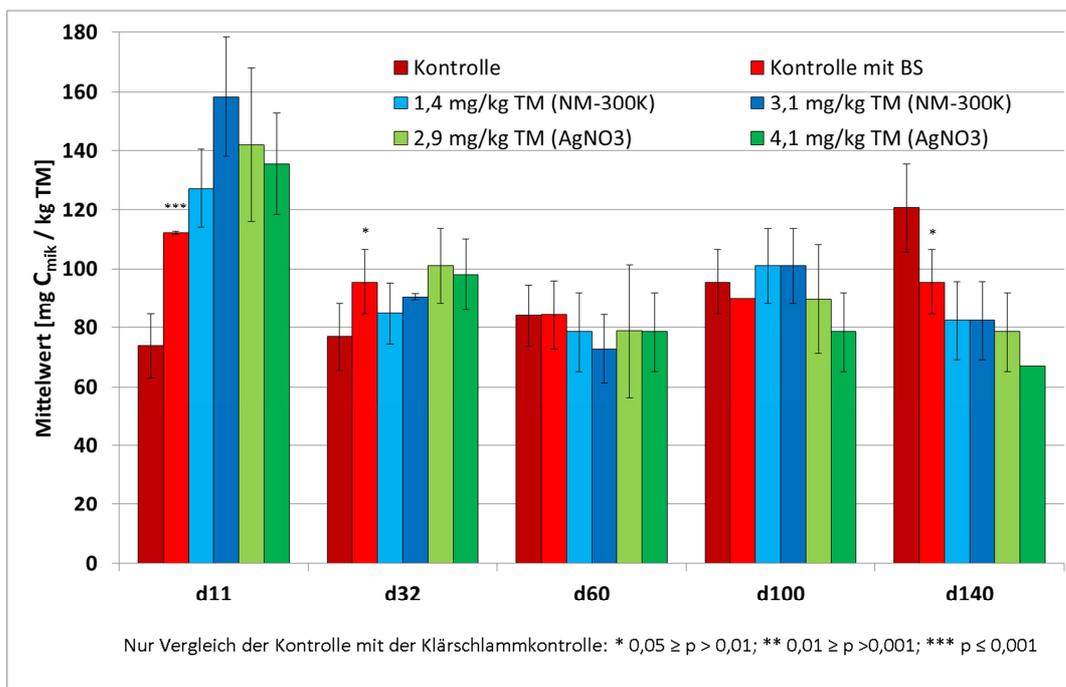
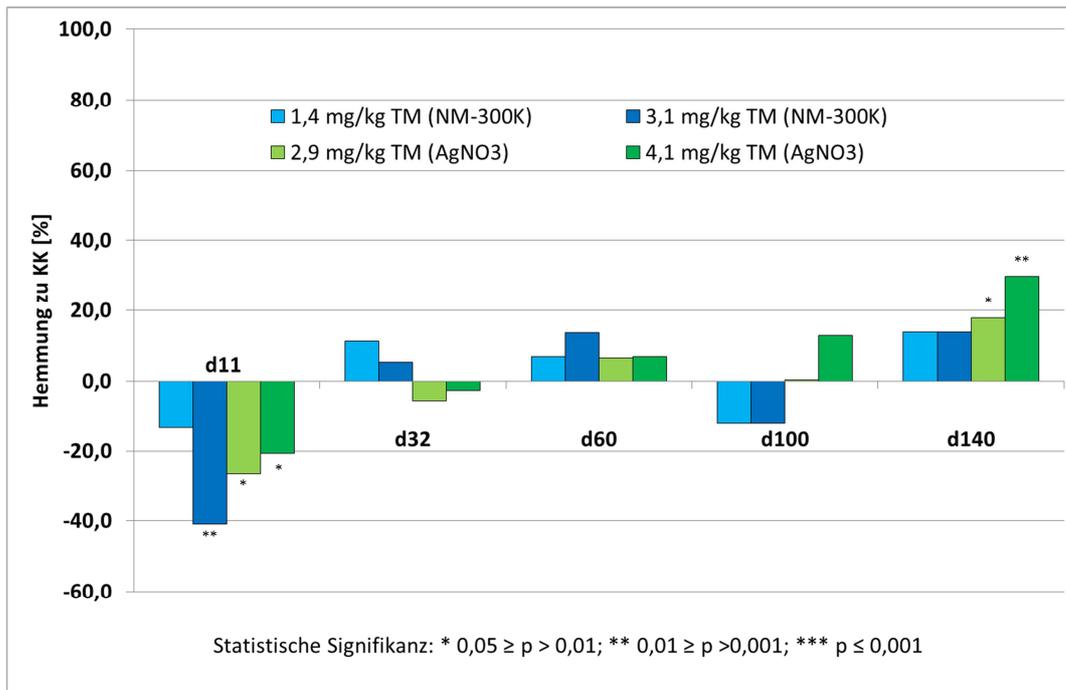


Abbildung 37: Langzeitversuch 5 - Mikrobielle Biomasse



**Abbildung 38: Langzeitversuch 5 - Hemmung der mikrobiellen Biomasse durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)**

#### 7.5.4 Basalatmung

Die Ergebnisse der Basalatmung an fünf Messzeitpunkten über 140 Tage wurden im Anhang in Tabelle 83 (Kapitel 13.2, Anhang) zusammengefasst. Die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen und statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen wurden in Abbildung 39 dargestellt. Abbildung 40 stellt die, durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufene, Wirkung auf die Atmungsaktivität der Mikroorganismen dar. Das Kriterium der Validität mit einem Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle von ≤ 15% wurde erfüllt.

An Tag 11 wurde die Atmungsaktivität in der Klärschlammkontrolle durch die Zugabe von Klärschlamm gefördert. Es wurde eine Erhöhung der Atmungsaktivität von 126,1% im Vergleich zur Kontrolle gemessen (Abbildung 39). NM-300K und AgNO<sub>3</sub> zeigte in den untersuchten Bodengehalten keine Wirkung auf die Bodenmikroorganismen und deren Atmungsaktivität.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch zu den Messzeitpunkten 32 und 60. Die Atmungsaktivität wurde durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> nicht beeinflusst. Lediglich die Förderung der Atmungsaktivität der Mikroorganismen nahm mit fortschreitendem

Versuchsverlauf ab. An Tag 32 wurde die Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle um 115,4%, an Tag 60 nur noch um 83,3% stimuliert. Bis zu Tag 100 war die Stimulation der Klärschlammkontrolle auf 37,5% gesunken (Abbildung 39). Zu diesem Messzeitpunkt wurde eine Hemmung der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen von 27,3% durch  $\text{AgNO}_3$  bei einem Bodengehalt von 2,9 mg/kg TM Boden festgestellt (Abbildung 40). Alle anderen untersuchten Bodengehalte an NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  zeigten eine Atmungsaktivität auf Kontrollniveau. Zu Versuchsende ergab sich eine Förderung der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur Kontrolle von 50,0% (Abbildung 39). Statistisch signifikante Unterschiede zur Klärschlammkontrolle konnten weder für NM-300K noch für  $\text{AgNO}_3$  festgestellt werden.

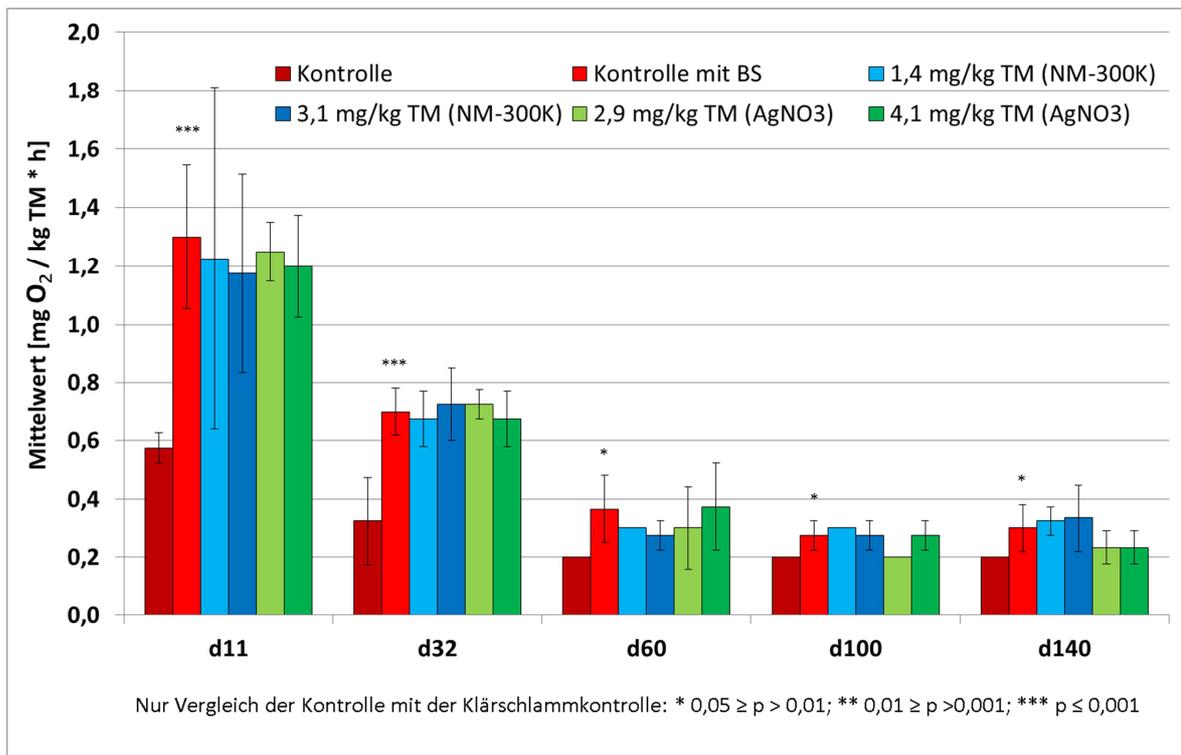
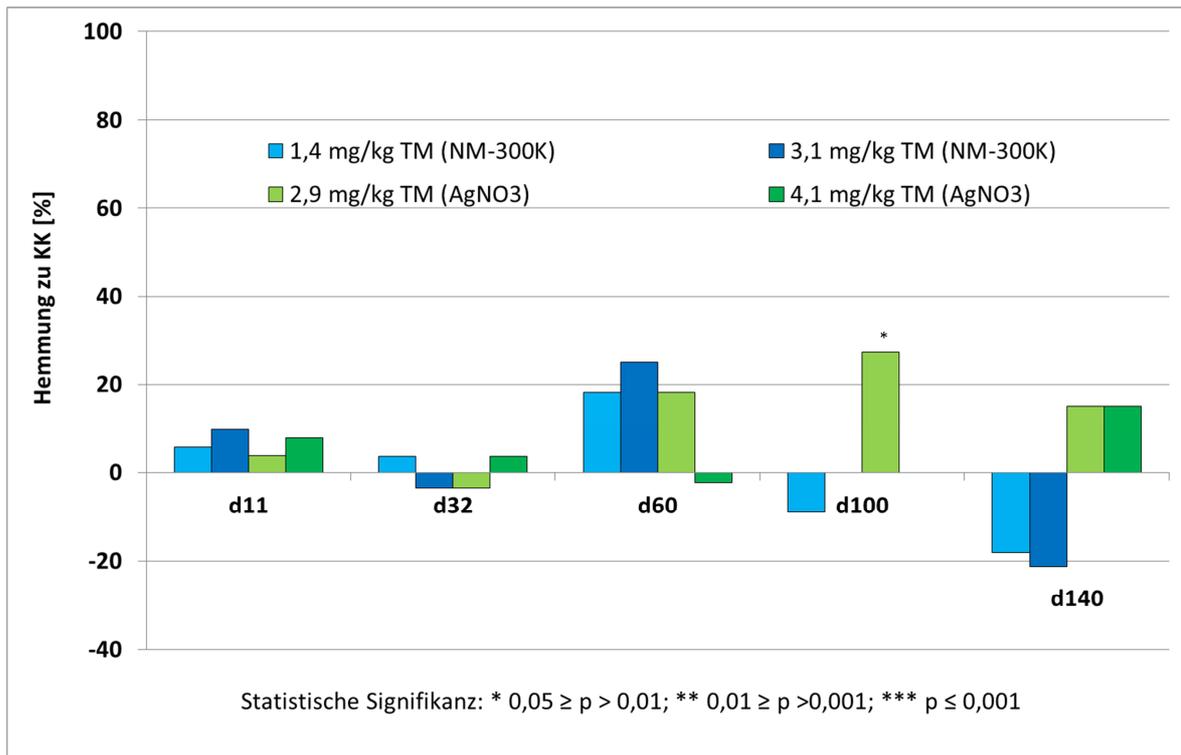


Abbildung 39: Langzeitversuch 5 - Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen



**Abbildung 40: Langzeitversuch 5 - Hemmung der Atmungsaktivität durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> im Vergleich zur Klärschlammkontrolle (KK)**

## 7.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieser Langzeitversuche war es, herauszufinden, ob mit NM-300K kontaminierter Klärschlamm über einen Zeitraum von 140 bis 180 Tagen abgebaut wird, und ob gleichzeitig mit diesem Abbau NM-300K wieder freigesetzt wird und die Aktivität der Bodenmikroorganismen beeinflusst. In Tabelle 50 ist eine Übersicht über die fünf Langzeitversuche, die Applikationsart, die erzielten Bodengehalte und die durchgeführten Testsysteme gegeben.

In Versuch 1 wurden Bodengehalte von 1,6 und 3,4 mg/kg TM Boden für NM-300K und 2,1 und 4,0 mg/kg TM Boden für AgNO<sub>3</sub> untersucht. Bei Versuch 5 wurden vergleichbare Bodengehalte von 1,4 und 3,1 mg/kg TM Boden für NM-300K und 2,9 und 4,1 mg/kg TM Boden für AgNO<sub>3</sub> erzielt. In beiden Versuchen wurden NM-300K bzw. AgNO<sub>3</sub> schrittweise mit einer finalen Kontaktzeit von 2 Stunden auf Klärschlamm gegeben. Im Anschluss wurde der Klärschlamm aufgearbeitet und in den Versuchsboden eingearbeitet.

**Tabelle 50: Übersicht über die durchgeführten Langzeitversuche (Applikationsart, Bodengehalte, Testsysteme)**

Langzeitversuch	Applikationsart	Überprüfte Testsysteme	Bodengehalt [mg/kg TM Boden]
<b>Versuch 1</b>	Zudosierung per Pipette; Kontaktzeit 2 Stunden	C-Transformation Pot. Ammoniumoxidation Mikrobielle Bodendiversität Pflanzentest	NM-300K: 1,6 / 3,4 AgNO <sub>3</sub> : 2,1 / 4,0
<b>Versuch 2</b>	Kläranlagensimulation mit Einlaufkonzentrationen von 0,4 / 4 und 9 mg/L für NM-300K und 0,4 mg/L für AgNO <sub>3</sub>	C-Transformation Basalatmung Pot. Ammoniumoxidation Pflanzentest	NM-300K: 2,8 / 19,0 / 46,8 AgNO <sub>3</sub> : 2,5
<b>Versuch 3</b>	Klärschlamm aus Kläranlagensimulation von Langzeitversuch 2; Anaerobe Faulung bei 40°C über 30 Tage	C-Transformation Basalatmung Pot. Ammoniumoxidation	NM-300K: 2,8 AgNO <sub>3</sub> : 2,5
<b>Versuch 4</b>	Kläranlagensimulation mit Einlaufkonzentrationen von 0,04 / 0,4 / 0,8 und 1,6 mg/L für NM-300K und 0,4 mg/L für AgNO <sub>3</sub>	C-Transformation Basalatmung Pot. Ammoniumoxidation Mikrobielle Bodendiversität Pflanzentest	NM-300K: 0,3 / 2,5 / 5,2 / 9,0 AgNO <sub>3</sub> : 3,4
<b>Versuch 5</b>	Zudosierung per Pipette; Kontaktzeit 2 Stunden	C-Transformation Basalatmung Pot. Ammoniumoxidation	NM-300K: 1,4 / 3,1 AgNO <sub>3</sub> : 2,9 / 4,1

In Versuch 2 wurden für NM-300K (2,8 mg/kg TM Boden) und AgNO<sub>3</sub> (2,5 mg/kg TM Boden) ebenfalls Bodengehalte betrachtet, die auf einem Niveau mit denen aus den Versuchen 1 und 5 lagen. Zusätzlich wurden zwei sehr hohe Bodengehalte an NM-300K von 19,0 und 46,8 mg/kg TM Boden untersucht. Eine Teilmenge des Klärschlammes mit den niedrigen Gehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> wurde aus Versuch 2 entnommen, über 30 Tage bei 40°C unter anaeroben Bedingungen gefault und im Anschluss in Versuch 3 untersucht. Bei Versuch 4 wurden sehr geringe Bodengehalte mit einer sehr hohen Umweltrelevanz betrachtet. Der niedrigste Gehalt an NM-300K im Boden lag hier bei 0,3 mg/kg TM Boden, dann wurden zwei Bodengehalte betrachtet, die mit denen in Versuch 1, 2 und 5 vergleichbar waren und bei 2,5 und 5,2 mg/kg TM Boden lagen und zuletzt ein hoher

Bodengehalt von 9,0 mg/kg TM Boden. Auch in diesem Versuch wurde als Referenz  $\text{AgNO}_3$  getestet. Hierbei ergab sich ein Bodengehalt von 3,4 mg/kg TM Boden, der ebenfalls mit den Gehalten, die in den Versuchen 1, 2 und 5 untersucht wurden, vergleichbar war.

### 7.6.1 Allgemeine Aussagen

Alle Ergebnisse der Versuchsansätze mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  wurden auf die Klärschlammkontrolle bezogen. In jedem der fünf Langzeitversuche, war zu beobachten, dass der pH-Wert über die Versuchsdauer von 140 bis 180 Tagen abnahm. Die Abnahme war in allen Versuchen vergleichbar.

Die Versuchsdauer wurde nach dem ersten Langzeitversuch, der über 180 Tage ging, angepasst, da die Aktivität der Mikroorganismen bei Lagerung des Bodens über 180 Tage stark abgenommen hatte. Durch die Abnahme der Aktivität waren Aussagen zu Stimulationen bzw. Hemmungen auf die Bodenmikroorganismen mit großen Unsicherheiten behaftet. Nachdem eine Versuchsdauer von 140 Tagen gewählt wurde, zeigte sich diese starke Abnahme der Aktivität nicht mehr.

In den ersten drei Langzeitversuchen wurden für jeden Versuchsansatz zwei Replikate angefertigt. Aufgrund dessen, dass Teilproben zur Analytik aus nur einem Gefäß entnommen wurden, änderte sich die Füllhöhe in den Versuchsgefäßen, wodurch es in den ersten Versuchen zum Versuchsende zu teilweise unterschiedlichen Ergebnissen je Replikat eines Ansatzes gekommen war. Um dem entgegenzuwirken, wurden die letzten beiden Versuche nur noch in einem Replikat angesetzt.

Für die Langzeitversuche 1 und 5 wurde Klärschlamm jeweils mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  versetzt, der Klärschlamm wurde entwässert und in den Versuchsboden eingearbeitet. Im Gegensatz dazu wurde in den Langzeitversuchen 2 und 4 jeweils eine Kläranlagensimulation mit verschiedenen Konzentrationen an NM-300K und mit  $\text{AgNO}_3$  durchgeführt. Nach der Kläranlagensimulation wurde der Klärschlamm wie in Versuch 1 und 5 auf- und in den Versuchsboden eingearbeitet. Ein Vergleich der Verteilung an Ag in dem Versuchsboden zeigt, dass die Standardabweichung für die erste Variante wesentlich höher (z.B. Versuch 5; NM-300K:  $3,1 \pm 1,5$  mg/kg TM Boden) war, als bei der Variante mit der Kläranlagensimulation (z.B. Versuch 4; NM-300K:  $2,5 \pm 0,2$  mg/kg TM Boden).

### 7.6.2 Kläranlagen

Für Langzeitversuch 2 und 4 wurden jeweils zwei Kläranlagensimulationen zur Applikation von NM-300K auf Klärschlamm durchgeführt. In der Kläranlagensimulation zu Versuch 2 wurden vergleichbare Konzentrationen an NM-300K in die Kläranlage eingeleitet. Auch hier zeigte sich keine Wirkung auf die Mikroorganismen des Klärschlammes, so dass die Ergebnisse aus Kapitel 5.8 validiert wurden. Bei der zweiten Kläranlagensimulation zu Versuch 4 wurden Konzentrationen gewählt, die eine größere Umweltrelevanz hatten.

Es zeigte sich bei keiner der beiden Kläranlagensimulationen eine Wirkung auf die Abbauleistung (DOC-Elimination) der Mikroorganismen des Klärschlammes bei Einlaufkonzentrationen von 0,04 mg/L bis 9 mg/L. Zusätzlich wurde untersucht, wo das in die Kläranlagen eingeleitete NM-300K bzw. AgNO<sub>3</sub> verbleibt. Durch die Messungen der Ag-Gehalte in Ein- und Auslauf der beiden Kläranlagensimulationen wurde bestätigt, dass zwischen 80 und 100% an NM-300K oder AgNO<sub>3</sub> im Klärschlamm sorbiert war.

Die Ergebnisse bestätigten, dass Silber vom Klärschlamm zum Großteil sorbiert wurde, und dass dieses Silber bei landwirtschaftlicher Nutzung des Klärschlammes als Dünger in den Boden gelangt.

### 7.6.3 Potentielle Ammoniumoxidation

In Tabelle 51 wurde dargestellt, wie sich die Aufbringung von Klärschlamm auf die Nitrifikanten auswirkt. Hierbei ist der Vergleich der Nitritproduktion in Kontrolle und Klärschlammkontrolle einander gegenübergestellt. In Tabelle 52 sind alle Langzeitversuche und die Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die Nitrifikanten dargestellt. In beiden Tabellen wurden nur statistisch signifikante Unterschiede eingetragen.

#### Einzelbeschreibung der Versuche

Der Vergleich von Klärschlammkontrolle und Kontrolle in Tabelle 51 zeigt, dass in allen Langzeitversuchen nach 11 Tagen eine starke Hemmung der Nitrifikanten durch den Klärschlamm zu beobachten war. Ab Tag 32 war die Nitritproduktion in der Klärschlammkontrolle entweder stimuliert oder auf einem Niveau mit der Kontrolle. An Tag 140 war die Nitritproduktion in der Klärschlammkontrolle im Vergleich zur

Kontrolle, außer in Versuch 3 mit gefaultem Klärschlamm, wieder signifikant gehemmt.

**Tabelle 51: Wirkung von Klärschlamm auf die Nitrifikanten im Vergleich der Klärschlammkontrolle mit der Kontrolle**

Versuch	D11	D32	D60	D100	D140*
Versuch 1	↓↓	↑↑	↑	↑↑	↓
Versuch 2	↓↓↓	↓	↑	↓	↓↓
Versuch 3	↓↓	0	0	0	↑↑
Versuch 4	↓↓↓	↑↑	0	0	↓↓
Versuch 5	↓	↑	↑↑	0	↓↓

\*V1 über 180 Tage; 0: Kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle; ↓: Hemmung ≤ 25%; ↓↓: Hemmung > 25% und ≤ 75%; ↓↓↓ Hemmung > 75%; ↑: Stimulation ≤ 25%; ↑↑: Stimulation > 25% und ≤ 75%; Stimulation > 75%

In Tabelle 52 wird dargestellt, wie sich NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die Nitritproduktion der Nitrifikanten auswirkt. In den Versuchen 1 und 5 passte sich an Tag 32 und 60 die Nitritproduktion in den Ansätzen mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> der in der Klärschlammkontrolle an. Erste schwache Effekte bei den Ansätzen mit AgNO<sub>3</sub> (Versuch 1: 4,0 mg/kg TM Boden) waren nach 60 Tagen zu beobachten. An Tag 100 und 180 zeigte sich in Versuch 1 eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung. In Versuch 5 ergab sich an Tag 100 eine vergleichbare Wirkung auf die Nitrifikanten wie in Versuch 1. Die Hemmung, die in Versuch 1 an Tag 180 festgestellt wurde, konnte in Versuch 5 nur für AgNO<sub>3</sub> bestätigt werden. In den Ansätzen mit NM-300K ergaben sich in Versuch 5 keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der Klärschlammkontrolle mehr. Die Hemmung, die nach 100 bzw. 180 Tagen durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> hervorgerufen wurde, war mit der aus den Untersuchungen mit reinem NM-300K nach Richtlinie (Kapitel 5.3) vergleichbar.

In Versuch 2 wurde bei einem Bodengehalt an NM-300K von 2,8 mg/kg TM Boden eine durchgängige Hemmung der Nitritproduktion ab Tag 32 beobachtet. Diese Hemmung war an den Tagen 32, 60 und 100 vergleichbar und verdoppelte sich an Tag 140, womit die Hemmung vergleichbar mit der aus Versuch 1 nach 180 Tagen war. Zusätzlich wurden in diesem Versuch sehr hohe Bodengehalte an NM-300K von

19,0 und 46,8 mg/kg TM Boden untersucht. Bei diesen Gehalten war die Nitritproduktion der Nitrifikanten durchgehend von Tag 32 bis Tag 140 um 69 bis 99% (19 mg/kg TM Boden) bzw. 66 bis 93% (46,8 mg/kg TM Boden) gehemmt. Auch in Versuch 2 war die Hemmung, die nach 100 bzw. 140 Tagen durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> bei Bodengehalten von 2,8 und 2,5 mg/kg TM Boden hervorgerufen wurde, vergleichbar mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.3 mit reinem NM-300K.

Obwohl in Langzeitversuch 4 die Art der Applikation von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf den Klärschlamm eine andere war, als in Versuch 1 und 5, zeigten sich bei vergleichbaren Bodengehalten zumindest für NM-300K vergleichbare Effekte. In den Bodengehalten dazwischen (2,5 und 5,2 mg/kg TM Boden) verstärkte sich die Wirkung mit zunehmender Dauer des Versuchs. Erste signifikante Hemmungen ergaben sich ab Tag 60, die bis zu Tag 140 weiter stiegen und denen aus Versuch 1 und denen aus den Untersuchungen mit reinem NM-300K (Kapitel 5.3) glichen. Bei einem Bodengehalt von 0,3 mg/kg TM Boden wurde keine Wirkung festgestellt. Bei einem sehr hohen Bodengehalt von 9,0 mg/kg TM Boden zeigte sich über den gesamten Versuchsverlauf eine Hemmung im Vergleich mit der Klärschlammkontrolle.

In Langzeitversuch 3 war ein Teil des Klärschlammes aus der Kläranlagensimulation zu Versuch 2 gefault worden. In diesem Versuch ergaben sich die Hemmungen, die in Versuch 2 für einen Bodengehalt an NM-300K von 2,8 mg/kg TM Boden festgestellt wurden, nicht. Die Nitritproduktion lag in diesem Ansatz durchgehend auf dem Niveau der Klärschlammkontrolle. Für AgNO<sub>3</sub> ergab sich lediglich an Tag 32 eine schwache Hemmung der Nitritproduktion. Zu den weiteren Messzeitpunkten glich auch hier die Nitritproduktion der der Klärschlammkontrolle.

### Übergeordnete Aussagen

Zusammenfassend zeigt sich anhand der Kontrollen aus den einzelnen Versuchen eine teils stärker und teils eher schwach ausgeprägte Stimulation der Nitrifikanten durch den Klärschlamm. Bis Tag 100 war die Nitritproduktion der Nitrifikanten in der Kontrolle auf einem Niveau oder stärker ausgeprägt als in der Klärschlammkontrolle. In Bereichen von Bodengehalten an NM-300K von 1,4 bis 5,2 mg/kg TM Boden kam es spätestens ab Tag 100 zu einer signifikanten Hemmung der Nitrifikanten. Diese Hemmung der Nitrifikanten lag in allen Langzeitversuchen auf einem vergleichbaren

Niveau wie in den Versuchen nach Richtlinie mit reinem NM-300K. Bei Bodengehalten von 9,0 bis 46,8 mg/kg TM Boden zeigte sich eine Wirkung schon ab einem früheren Zeitpunkt und konstant über den Rest der Versuchsdauer.

**Tabelle 52: Veranschaulichung der Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die Nitrifikanten in den Langzeitversuchen 1 bis 5**

Versuch	Testgegenstand	Bodengehalt	D11	D32	D60	D100	D140*
<b>V1</b>	NM-300K	1,6	↓↓	0	0	0	0
		3,4	↓↓	0	0	↓↓	↓↓
	AgNO <sub>3</sub>	2,1	0	0	0	↓	↓
		4,0	↓↓	0	↓	↓↓	↓↓↓
<b>V2</b>	NM-300K	2,8	0	↓	↓	↓	↓↓
		19,0	0	0	↓↓	↓↓↓	↓↓↓
		46,8	0	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
	AgNO <sub>3</sub>	2,5	0	0	0	0	↓↓↓
<b>V3</b>	NM-300K	2,8	0	0	0	0	0
	AgNO <sub>3</sub>	2,5	0	↓	0	0	0
<b>V4</b>	NM-300K	0,3	0	0	0	0	0
		2,5	0	0	0	0	0
		5,2	0	0	↓	↓↓	↓↓↓
		9,0	0	↓	↓↓	↓↓	↓↓↓
	AgNO <sub>3</sub>	3,4	0	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓
<b>V5</b>	NM-300K	1,4	0	↓	0	0	0
		3,1	0	0	0	↓↓	0
	AgNO <sub>3</sub>	2,9	0	0	0	0	0
		4,1	0	0	0	↓↓	↓↓

\*V1 über 180 Tage; 0: Kein signifikanter Unterschied zur Klärschlammkontrolle; ↓: Hemmung ≤ 25%;  
 ↓↓: Hemmung > 25% und ≤ 75%; ↓↓↓ Hemmung > 75%

Die Versuche deuten darauf hin, dass es zu einem Abbau des Klärschlammes mit zunehmender Versuchsdauer kommt. Einhergehend mit diesem Abbau wurde eine verstärkte Hemmung der Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> mit Gehalts-

Wirkungs-Beziehungen beobachtet. NM-300K und AgNO<sub>3</sub> führen zu teilweise starken Hemmungen der Nitritproduktion der Nitrifikanten, die vergleichbar mit denen aus den Versuchen nach Richtlinie in Kapitel 5.3 sind.

#### **7.6.4 C-Transformation**

In Tabelle 53 wurde dargestellt, wie sich die Aufbringung von Klärschlamm auf die mikrobielle Biomasse auswirkt. Hierbei wurde die mikrobielle Biomasse in Kontrolle und Klärschlammkontrolle einander gegenübergestellt. In Tabelle 54 sind alle Langzeitversuche und die Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die mikrobielle Biomasse dargestellt. In beiden Tabellen wurden nur statistisch signifikante Unterschiede eingetragen.

##### *Einzelbeschreibung der Versuche*

Zu den Messzeitpunkten 11 und 32 war in allen Versuchen, außer Versuch 1, die mikrobielle Biomasse in der Klärschlammkontrolle signifikant höher als in der Kontrolle. In Versuch 1 ergaben sich für Kontrolle und Klärschlammkontrolle vergleichbare Werte zu jedem Messzeitpunkt. Spätestens nach 60 Tagen, mit Ausnahme von Versuch 2, war die mikrobielle Biomasse in der Klärschlammkontrolle auf einem Niveau mit der Kontrolle oder im Vergleich zur Kontrolle signifikant gehemmt. Lediglich in Versuch 2 zeigte sich auch an Tag 60 eine Stimulation der mikrobiellen Biomasse beim Vergleich von Kontrolle und Klärschlammkontrolle. Im Anschluss an Tag 100 und 140 zeigte sich in der Klärschlammkontrolle allerdings auch die stärkste Hemmung der mikrobiellen Biomasse im Vergleich mit der Kontrolle.

**Tabelle 53: Wirkung von Klärschlamm auf die Biomasseproduktion im Vergleich der Klärschlammkontrolle mit der Kontrolle**

Versuch	D11	D32	D60	D100	D140*
V1	0	0	0	0	0
V2	↑↑↑	↑↑	↑	↓↓	↓↓
V3	↑↑	↑	↓↓	↓	0
V4	↑↑	↑	0	0	0
V5	↑↑	↑	0	0	↑

\*V1 über 180 Tage; 0: Kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle; ↓: Hemmung ≤ 25%; ↓↓: Hemmung > 25% und ≤ 75%; ↓↓↓ Hemmung > 75%; ↑: Stimulation ≤ 25%; ↑↑: Stimulation > 25% und ≤ 75%; Stimulation > 75%

In Versuch 1 kam es zu signifikanten Unterschieden im Vergleich zur Klärschlammkontrolle ab Tag 60 und 100 bei einem Bodengehalt an AgNO<sub>3</sub> von 4,0 mg/kg TM Boden. NM-300K zeigte keinerlei Wirkung auf die mikrobielle Biomasse bis zu Tag 180. An Tag 180 waren starke Hemmungen der Biomasseproduktion in allen Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> festzustellen. In Versuch 5 zeigte sich bei vergleichbaren Bodengehalten wie in Versuch 1 an Tag 11 zunächst eine Stimulation der mikrobiellen Biomasse, die signifikant in allen Bodengehalten außer bei 1,4 mg/kg TM Boden für NM-300K war. An Tag 32 / 60 und 100 wurden keine signifikanten Unterschiede der mikrobiellen Biomasse im Vergleich zur Klärschlammkontrolle festgestellt. Eine signifikante Hemmung der Biomasseproduktion durch AgNO<sub>3</sub> in Abhängigkeit des Bodengehaltes wurde an Tag 140 gemessen. Diese Hemmung war vergleichbar mit der Hemmung, die in Versuch 1 an Tag 100 gemessen worden war. NM-300K zeigte keine Wirkung auf die mikrobielle Biomasse, wobei auch hier eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen an Tag 100 in Versuch 1 festzustellen war.

Obwohl in Langzeitversuch 2 die Art der Applikation von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf den Klärschlamm eine andere war als in Versuch 1 und 5, zeigten sich bei vergleichbaren Bodengehalten (NM-300K: 2,8 mg/kg TM Boden; AgNO<sub>3</sub>: 2,5 mg/kg TM Boden) zumindest für NM-300K vergleichbare Effekte wie in Langzeitversuch 1. Bei einem Bodengehalt von 2,8 mg/kg TM Boden ergaben sich von Tag 11 bis Tag

100 keine Effekte auf die Biomasseproduktion. An Tag 140 wurde eine Hemmung der Biomasseproduktion von 39,6% hervorgerufen, die mit der aus Langzeitversuch 1 an Tag 180 (42,2%) vergleichbar war. Für einen Bodengehalt an  $\text{AgNO}_3$  von 2,5 mg/kg TM Boden konnten keine Parallelen zu Versuch 1 und 5 bei vergleichbaren Bodengehalten festgestellt werden. Zusätzlich wurde in Langzeitversuch 2 ein hoher Bodengehalt an NM-300K von 46,8 mg/kg TM Boden untersucht. Hier wurde eine stetige Hemmung der Biomasseproduktion von Tag 11 bis Tag 100 von etwa 40% gemessen. Erst an Tag 140 stieg diese Hemmung auf etwa 60% an.

Auch in Langzeitversuch 4 wurden vergleichbare Bodengehalte an NM-300K untersucht wie in Versuch 1, 2 und 5. Es ergab sich allerdings ein verändertes Bild im Vergleich mit den zuvor genannten Versuchen. An Tag 32 war nur in den beiden niedrigsten Bodengehalten von 0,3 und 2,5 mg/kg TM Boden ein signifikanter Unterschied zur Klärschlammkontrolle festzustellen. Diese waren mit einer Hemmung von ca. 20% allerdings sehr gering. Nach 60 Tagen wurde eine Hemmung der Biomasseproduktion bei Bodengehalten von 2,5 bis 5,2 mg/kg TM Boden festgestellt, die vergleichbar mit denen von Tag 60 und 100 bei Versuch 1 waren. Lediglich bei den beiden höchsten Bodengehalten von 5,2 und 9,0 mg/kg TM Boden stieg die Hemmung der Biomasseproduktion im Anschluss noch. Bei 0,3 und 2,5 mg/kg TM Boden waren nach 100 Tagen keine signifikanten Unterschiede zur Klärschlammkontrolle mehr festzustellen. Nach 140 Tagen zeigte sich bei keinem Bodengehalt eine Wirkung auf die Biomasseproduktion. Für  $\text{AgNO}_3$  wurde in diesem Versuch ein vergleichbarer Verlauf festgestellt.

In Langzeitversuch 3 mit gefaultem Klärschlamm wurden die Effekte, die bei Versuch 2 aufgetreten waren, nicht mehr gefunden. Statistisch signifikante Effekte ergaben sich nur in diesem Versuch für NM-300K an Tag 32 mit einer Hemmung im Vergleich zur Klärschlammkontrolle von ca. 20% und für  $\text{AgNO}_3$  an Tag 100 (Hemmung im Vergleich zur Klärschlammkontrolle von ca. 40%).

**Tabelle 54: Veranschaulichung der Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die Biomasseproduktion in den Langzeitversuchen 1 bis 5**

Versuch	Testgegenstand	Bodengehalt	D11	D32	D60	D100	D140*
<b>V1</b>	NM-300K	1,6	0	0	0	0	↓↓
		3,4	0	0	0	0	↓↓
	AgNO <sub>3</sub>	2,1	0	0	0	0	↓↓
		4,0	0	0	↓	↓↓	↓↓
<b>V2</b>	NM-300K	2,8	0	0	0	0	↓↓
		19,0	↓	↓	0	0	↓↓
		46,8	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	AgNO <sub>3</sub>	2,5	↓	↓↓	0	0	0
<b>V3</b>	NM-300K	2,8	0	↓	0	0	0
	AgNO <sub>3</sub>	2,5	0	0	0	↓↓	0
<b>V4</b>	NM-300K	0,3	0	↓	0	0	0
		2,5	0	↓	↓↓	0	0
		5,2	0	0	↓↓	↓↓	0
		9,0	0	0	↓↓	↓↓	0
	AgNO <sub>3</sub>	3,4	0	0	↓↓	0	0
<b>V5</b>	NM-300K	1,4	0	0	0	0	0
		3,1	↓↓	0	0	0	0
		2,9	↓↓	0	0	0	↓
	AgNO <sub>3</sub>	4,1	↓	0	0	0	↓↓

\*V1 über 180 Tage; 0: Kein signifikanter Unterschied zur Klärschlammkontrolle; ↓: Hemmung ≤ 25%;  
 ↓↓: Hemmung > 25% und ≤ 75%; ↓↓↓ Hemmung > 75%

Übergeordnete Aussagen

Zusammenfassend zeigt sich anhand der Kontrollen aus den einzelnen Versuchen eine teils stärker und teils eher schwach ausgeprägte Stimulation der mikrobiellen Biomasse durch den Klärschlamm zu Beginn der Versuche. Ab Tag 60, spätestens ab Tag 100, war die mikrobielle Biomasse in der Klärschlammkontrolle auf Niveau

der Kontrolle. In Versuch 2 kam es ab Tag 100 zu einer Hemmung der mikrobiellen Biomasse.

In Bereichen von Bodengehalten an NM-300K von 1,4 bis 5,2 mg/kg TM Boden kam es zu signifikanten Hemmungen der mikrobiellen Biomasse. Auftretende Hemmungen lagen in den verschiedenen Versuchen auf einem Niveau. Es zeigte sich allerdings, dass es teilweise ab Tag 140 bzw. 180, teilweise aber auch ab Tag 60 zu einer Hemmung der mikrobiellen Biomasse kam. Trat die Hemmung an Tag 60 oder früher auf, wurde der Effekt im Anschluss zumeist nicht mehr beobachtet. Die festgestellten Hemmungen sind ebenfalls mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.2 zur Untersuchung von reinem NM-300K nach Richtlinie vergleichbar.

Auch für  $\text{AgNO}_3$  zeigte sich, dass es zu einer Hemmung der mikrobiellen Biomasse bei Bodengehalten zwischen 2,5 und 4,1 mg/kg TM Boden kam, die allerdings ebenso wie bei NM-300K zu verschiedenen Zeitpunkten auftraten. Auftretende Hemmungen waren hierbei nicht nur zwischen Tag 60 und 140, sondern in Versuch 2 sogar an Tag 11 und 32 zu ermitteln.

#### **7.6.5 Basalatmung**

In Tabelle 55 wurde dargestellt, wie sich die Aufbringung von Klärschlamm auf die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen auswirkt. Hierbei ist der Vergleich der Atmungsaktivität in Kontrolle und Klärschlammkontrolle einander gegenübergestellt. In Tabelle 56 sind alle Langzeitversuche und die Wirkung von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  auf die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen dargestellt. In beiden Tabellen wurden nur statistisch signifikante Unterschiede eingetragen.

Die Ergebnisse der Basalatmung in den Langzeitversuch zeigen, dass es zu einer starken Erhöhung der Atmungsaktivität der Mikroorganismen durch Klärschlamm kommt. Dieses Ergebnis zeigte sich in allen Langzeitversuchen, außerdem in Langzeitversuch 3, in dem der Klärschlamm vor der Untersuchung gefault wurde und leicht verfügbare Kohlenstoffquellen entfernt wurden. In diesem Versuch kam es an Tag 32 zu einer Hemmung der Atmungsaktivität der Mikroorganismen. Im Anschluss war die Atmungsaktivität in Kontrolle und Klärschlammkontrolle von Tag 60 bis Tag 140 vergleichbar.

**Tabelle 55: Wirkung von Klärschlamm auf die Atmungsaktivität im Vergleich der Klärschlammkontrolle mit der Kontrolle**

Versuch	D11	D32	D60	D100	D140*
V2	n.b.	↑↑↑	↑↑	0	0
V3	n.b.	↓↓	0	0	0
V4	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	0	0
V5	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑

\*V1 über 180 Tage; n.b.: nicht bestimmt; 0: Kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle; ↓: Hemmung ≤ 25%; ↓↓: Hemmung > 25% und ≤ 75%; ↓↓↓ Hemmung > 75%; ↑: Stimulation ≤ 25%; ↑↑: Stimulation > 25% und ≤ 75%; ↑↑↑ Stimulation > 75%

### Einzelbeschreibung der Versuche

In Langzeitversuch 2 wurden erste signifikante Hemmungen der Atmungsaktivität durch NM-300K an Tag 60 festgestellt. Es zeigten sich Hemmungen sowohl bei einem Bodengehalt von 2,8 mg/kg TM Boden, als auch bei sehr hohen Bodengehalten von 19,0 und 46,8 mg/kg TM Boden. Messungen nach 100 Tagen zeigten diese signifikanten Unterschiede zur Klärschlammkontrolle nicht mehr. Nur ein Bodengehalt von 46,8 mg/kg TM Boden führte zu einer signifikanten Hemmung der Atmungsaktivität. Nach 140 Tagen wiederum ergab sich eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung für NM-300K. Ein Bodengehalt an AgNO<sub>3</sub> von 2,5 mg/kg TM Boden führte über den ganzen Versuchsverlauf zu signifikanten Unterschieden im Vergleich zur Klärschlammkontrolle.

Die Wirkung auf die Atmungsaktivität, die bei Bodengehalten von 2,8 mg/kg TM Boden (NM-300K) und 2,5 mg/kg TM Boden (AgNO<sub>3</sub>) in Versuch 2 festgestellt wurde, war in Versuch 3 mit gefaultem Klärschlamm zu keiner Zeit in vergleichbarem Maß zu finden. In Versuch 3 ergab sich lediglich an Tag 32 eine signifikante Stimulation der Atmungsaktivität durch NM-300K. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen ergaben sich weder durch NM-300K noch durch AgNO<sub>3</sub> signifikante Unterschiede zur Klärschlammkontrolle.

In Langzeitversuch 4 wurde in keiner der untersuchten Bodengehalte an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> eine Wirkung auf die Atmungsaktivität an Tag 11 und 32 festgestellt. An Tag 60 wurde die Atmungsaktivität durch NM-300K vermindert. Es ergaben sich

signifikante Hemmungen bei Bodengehalten von 2,5 bis 9,0 mg/kg TM Boden. Diese Hemmungen zeigten sich im weiteren Verlauf des Versuchs nicht mehr. An Tag 100 und 140 wurden Stimulationen der Atmungsaktivität der Mikroorganismen gemessen, die allerdings nicht statistisch signifikant waren. Bei einem Bodengehalt an  $\text{AgNO}_3$  von 3,4 mg/kg TM Boden zeigten sich über den gesamten Versuchsverlauf keine signifikanten Unterschiede zur Klärschlammkontrolle.

Vergleichbare Ergebnisse wie in Langzeitversuch 4 wurden auch in Langzeitversuch 5 gemessen. Die untersuchten Bodengehalte in beiden Versuchen lagen in einem vergleichbaren Bereich. In Langzeitversuch 5 ergab sich nur an Tag 100 bei einem Gehalt von 2,9 mg/kg TM Boden eine Hemmung der Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen. Bei allen anderen Bodengehalten an NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  konnte über den gesamten Versuchsverlauf keine Wirkung auf die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen festgestellt werden.

#### Übergeordnete Aussagen

Es zeigt sich, dass die Atmungsaktivität der Bodenmikroorganismen nur bei sehr hohen Bodengehalten an NM-300K beeinflusst wird. Nur in Langzeitversuch 2 wurde bei dem höchsten untersuchten Bodengehalt von 46,8 mg/kg TM Boden eine dauerhafte Hemmung der Atmungsaktivität festgestellt. In diesem Versuch zeigte hingegen  $\text{AgNO}_3$  bei einem vergleichsweise niedrigen Bodengehalt von 3,4 mg/kg TM Boden ebenfalls eine dauerhafte Hemmung.

**Tabelle 56: Veranschaulichung der Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die Atmungsaktivität in den Langzeitversuchen 2 bis 5**

Versuch	Testgegenstand	Bodengehalt	D11	D32	D60	D100	D140
<b>V2</b>	NM-300K	2,8	n.b.	0	↓↓	0	0
		19,0	n.b.	0	↓↓	0	↓↓
		46,8	n.b.	0	↓↓	↓↓	↓↓
	AgNO <sub>3</sub>	2,5	n.b.	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
<b>V3</b>	NM-300K	2,8	n.b.	↑↑	0	0	0
		AgNO <sub>3</sub>	2,5	n.b.	0	0	0
<b>V4</b>	NM-300K	0,3	0	0	0	0	0
		2,5	0	0	↓	0	0
		5,2	0	0	↓↓	0	0
		9,0	0	0	↓↓	0	0
		AgNO <sub>3</sub>	3,4	0	0	0	0
	<b>V5</b>	NM-300K	1,4	0	0	0	0
		3,1	0	0	0	0	0
	AgNO <sub>3</sub>	2,9	0	0	0	↓↓	0
		4,1	0	0	0	0	0

n.b.: nicht bestimmt; 0: Kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle; ↓: Hemmung ≤ 25%; ↓↓: Hemmung > 25% und ≤ 75%; ↓↓↓: Hemmung > 75%; ↑: Stimulation ≤ 25%; ↑↑: Stimulation > 25% und ≤ 75%; Stimulation > 75%

### 7.6.6 Mikrobielle Bodendiversität

Die mikrobielle Bodendiversität wurde in Langzeitversuch 1 und 4 betrachtet. Die Messungen der mikrobiellen Bodendiversität wurden an Tag 32 und 100 (Versuch 1) bzw. Tag 60 und 100 (Versuch 4) durchgeführt.

#### Einzelbeschreibung der Versuche

In Versuch 1 zeigte sich, dass es an Tag 32 zur Stimulation des Abbaus von Cellulose und der Hydrolyse von Phosphatestern und Oligopeptiden bzw. Aminosäuren kam. Nach 100 Tagen hingegen war lediglich in dem niedrigen Bodengehalt an NM-300K noch eine Stimulation der Hydrolyse von Phosphatestern

zu messen. Nun wurde zum einen der Abbau von Chitin als auch die Hydrolyse der Aminosäuren in Abhängigkeit des Bodengehaltes durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> signifikant gehemmt.

In Langzeitversuch 4 zeigen sich die Stimulationen, die in Versuch 1 nach 32 Tagen festgestellt wurden, nicht mehr. Die Hydrolyse der Phosphatester wird durch NM-300K bei Bodengehalten von 2,5 bis 9,0 mg/kg TM Boden signifikant gehemmt. Auch die Hydrolyse von Aminosäuren wird bei hohen Bodengehalten an NM-300K reduziert. AgNO<sub>3</sub> führt bei einem Bodengehalt von 3,4 mg/kg TM Boden ebenfalls zu einer Hemmung der Hydrolyse von Aminosäuren. Nach 100 Tagen zeigten sich auch in Versuch 4 Hemmungen der Hydrolyse von Aminosäuren, die mit denen aus Versuch 1 vergleichbar waren. In Versuch 4 wurde zusätzlich auch die Hydrolyse von Phosphatdiestern durch NM-300K vermindert. AgNO<sub>3</sub> und NM-300K in dem höchsten Bodengehalt (9,0 mg/kg TM Boden) führten zusätzlich zu einer schwachen Stimulation des Abbaus von Cellulose.

#### Übergeordnete Aussagen

Die Versuche zur mikrobiellen Bodendiversität zeigen, dass in Versuch 1 durch die Zugabe von Klärschlamm die Abbauaktivität einiger Mikroorganismengruppen stimuliert wird. Die Messungen an Tag 60 in Versuch 4 weisen auf erste Hemmungen bestimmter Mikroorganismengruppen hin. Hier zeigte sich, dass vor allem die Hydrolyse von Oligopeptiden (Aminosäuren) betroffen ist. Nach 100 Tagen wurde ebenfalls die Abbauaktivität der Mikroorganismengruppen gehemmt, die eine Hydrolyse von Oligopeptiden (Aminosäuren) und zusätzlich auch von Phosphatestern durchführen. Auch diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass erst nach dem Abbau des Klärschlammes eine Wirkung durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die Bodenmikroorganismen hervorgerufen wird.

#### **7.6.7 Pflanzentest**

Ein Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208 wurde in Langzeitversuch 1 und 2 nach jeweils 140 bzw. 180 Tagen durchgeführt. In Langzeitversuch 4 wurde das Pflanzenwachstum nach 32 und 100 Tagen untersucht.

### Einzelbeschreibung der Versuche

Die Ergebnisse aus Versuch 1 und 2 sind vergleichbar. In Versuch 1 wurde eine Hemmung des Pflanzenwachstums bei Bodengehalten an NM-300K von 1,6 und 3,4 mg/kg TM Boden festgestellt, die in einem Bereich von 25,5 bis 27,5% lag. Auch AgNO<sub>3</sub> verminderte das Pflanzenwachstum, hier lag die Hemmung in einem Bereich von 18,3 bis 26,6% bei Bodengehalten von 2,1 und 4,0 mg/kg TM Boden. Bei Bodengehalten von 2,8 mg/kg TM Boden für NM-300K und 2,5 mg/kg TM Boden für AgNO<sub>3</sub> ergaben sich in Versuch 2 signifikante Hemmungen des Wachstums von *Phaseolus aureus* L. von 26,7 und 29,8%. Die durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> nach 140 bzw. 180 Tagen hervorgerufene Hemmung war gut vergleichbar. Ebenso war die Hemmung des Pflanzenwachstums von *Phaseolus aureus* L. mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen nach Richtlinie mit reinem NM-300K (Kapitel 5.6) vergleichbar. Hier ergab sich für einen Bodengehalt an NM-300K von 1 mg/kg TM Boden eine Hemmung von 26,7% und bei 4,5 mg/kg TM Boden in einem weiteren Versuch eine Hemmung von 20,6%. In Versuch 2 zeigte sich zusätzlich, dass die Hemmung mit zunehmendem Gehalt an NM-300K im Boden abnahm (bei 19,0 mg/kg TM Boden) oder sogar stimulierend auf das Wachstum der Pflanze wirkte (46,8 mg/kg TM Boden).

In Langzeitversuch 4 zeigte sich in dem Versuch nach 32 Tagen, dass zwar mit steigendem Bodengehalt an NM-300K auch die Hemmung des Pflanzenwachstums stieg, dass aber die Unterschiede nicht statistisch signifikant waren. AgNO<sub>3</sub> führte nach 32 Tagen hingegen zu einer Hemmung des Pflanzenwachstums von 46%. Nach 100 Tagen ergab sich weiterhin eine Gehalts-Wirkungs-Beziehung für NM-300K. Bei 5,2 und 9,0 mg/kg TM Boden zeigten sich eine signifikante Hemmung des Wachstums von 20,0 und 33,9% im Vergleich zur Klärschlammkontrolle. Die Hemmung war somit mit der aus Versuch 1 und 2 nach 140 bzw. 180 Tagen und auch mit den Ergebnissen der Versuche mit reinem NM-300K vergleichbar. AgNO<sub>3</sub> hemmte auch nach 100 Tagen das Pflanzenwachstum weiterhin, wobei sich die Hemmung von 46,0% auf 29,6% verringert hatte.

Bei dem Pflanzentest nach Langzeitversuch 1 wurden die Pflanzen nach Versuchsende in Wurzel, Spross und Blätter unterteilt und eine Messung des Ag-Gehaltes in den einzelnen Pflanzenteilen vorgenommen. Hierbei zeigte sich, dass

der Ag-Gehalt in den Wurzeln am höchsten war, dass aber auch Silber in Spross und Blättern gemessen werden konnte.

#### Übergeordnete Aussagen

Auch in den Pflanzentests zeigt sich, dass signifikante Effekte mit NM-300K erst nach 100 Tagen, also mit fortschreitendem Abbau des Klärschlammes, auftraten. Die Effekte, die in den Langzeitversuchen durch NM-300K auf das Pflanzenwachstum von *Phaseolus aureus* L. ausgeübt wurden, waren vergleichbar mit denen aus den Untersuchungen nach Richtlinie mit reinem NM-300K. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Silber nicht nur in oder an den Wurzeln zu finden war, sondern, dass auch in Spross und sogar Blättern geringe Gehalte an Silber gemessen wurden.

## **8 Risikocharakterisierung aus den erzielten Ergebnissen für NM 300K**

Das Ziel der Dissertation bestand darin, eine Risikocharakterisierung für NM-300K durchzuführen. In Kapitel 5 wurde hierzu die Wirkung von NM-300K auf die verschiedenen Trophieebenen des terrestrischen Ökosystems betrachtet. Darüber hinaus wurden Verbleib und Wirkung von NM-300K im Atmungshemmtest als Screening Versuch zur Wirkung auf Mikroorganismen im Klärschlamm und in Kläranlagensimulationen untersucht. Mit Hilfe der Untersuchungen zu Wirkung und Verbleib in Kläranlagen konnten Rückschlüsse über den Weg, den NM-300K bis in das terrestrische Ökosystem geht, gezogen werden. In Kapitel 7 wurde untersucht, ob die Effekte, die in Kapitel 5 erzielt wurden, auch in einem realistischen Nutzungsszenario, der Aufbringung von NM-300K-haltigem Klärschlamm auf landwirtschaftliche Nutzflächen als Dünger, beobachtet werden konnten.

Im Folgenden wurden die einzelnen Schritte, die zur Durchführung einer Risikocharakterisierung benötigt werden, beschrieben.

### **8.1 Grundlage einer Risikocharakterisierung**

Die Risikocharakterisierung wurde auf Grundlage der Richtlinie ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment (2008) durchgeführt.

Für die Durchführung einer klassischen Risikocharakterisierung werden zwei Parameter, PEC (predicted environmental concentration) und PNEC (predicted non-effect concentration) benötigt. Die Abschätzung der Konzentration einer Chemikalie in der Umwelt wird auf Basis von verschiedenen Informationen durchgeführt. Hierbei werden sowohl die physikalisch-chemischen Eigenschaften, die gesamte Produktionsmenge der Chemikalie, aber auch die Nutzung und das Freisetzungverhalten betrachtet. Aus diesen Parametern wird letztlich die PEC bestimmt. Die PNEC entsteht auf Grundlage ökotoxikologische Untersuchungen, wie sie in Kapitel 5 für das terrestrische Ökosystem durchgeführt wurden. Die Wirkung der Chemikalie wird auf verschiedene Trophieebenen, Mikroorganismen in Böden, Pflanzen und Regenwürmer, betrachtet. Für die Bestimmung der PNEC werden hierbei die NOEC und die EC<sub>10</sub> genutzt, wobei die Konzentration, bei der einer der untersuchten Organismen am Sensitivsten reagiert hat, ausgewählt wird.

In Abhängigkeit der Anzahl an Organismen auf die die Wirkung der Chemikalie untersucht wurde, wird ein Bewertungsfaktor auf die Wirkkonzentration beaufschlagt. In der Richtlinie ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment (2008) wird geregelt, welcher Bewertungsfaktor bei entsprechendem Grundlage an Daten genutzt wird. Der Bewertungsfaktor variiert, in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Informationen (Anzahl an Organismen verschiedener Trophieebenen und berechnete Endpunkte NOEC bzw. EC<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub>) von 1 bis 1000. Nachdem sowohl PEC als auch PNEC bekannt sind, wird der Quotient aus PEC zu PNEC gebildet. Bei einem Wert des Quotienten aus PEC zu PNEC über 1 wird zunächst von einem Risiko für das untersuchte Ökosystem ausgegangen.

## 8.2 Risikocharakterisierung zum Klärschlammfad

Die Wirkung wurde von NM-300K-haltigem Klärschlamm, aufgebracht als Dünger auf landwirtschaftliche Flächen, über 140 bzw. 180 Tage untersucht. Die Ergebnisse dieser Langzeitversuche, dargestellt in Kapitel 7, zeigen, dass Silber mit zunehmender Versuchsdauer freigesetzt wurde und es zu einer hemmenden Wirkung auf die untersuchten Organismen kam. Eine hemmende Wirkung wurde beobachtet, wenn die Ansätze aus Boden und NM-300K-haltigem Klärschlamm zwischen 60 und 180 Tagen gelagert wurden. Es zeigte sich, dass die Nitrifikanten am sensitivsten auf die Freisetzung von Silber reagierten, dass aber auch die mikrobielle Biomasse erheblich beeinträchtigt wurde.

Die zum Ende der Versuche festgestellten Wirkungen auf Nitrifikanten, mikrobielle Biomasse und auch Pflanzenwachstum waren vergleichbar mit denen, die in den Versuchen in Kapitel 5 - Untersuchung der Wirkung von NM-300K nach Richtlinie - erzielt wurden. Aufgrund dieser Vergleichbarkeit wurde die Risikoabschätzung für NM-300K-haltigen Klärschlamm, der als Dünger auf landwirtschaftlich genutzte Flächen aufgetragen wird, auf Basis der Ergebnisse aus Kapitel 5 durchgeführt.

## 8.3 Untersuchung von NM-300K nach Richtlinie

Zur Durchführung der Risikocharakterisierung wurden die NOEC und EC<sub>10</sub> aus den Versuchen zur Wirkung von NM-300K auf Nitrifikanten und die mikrobielle Biomasse (Tabelle 11), auf die Reproduktion von *Eisenia andrei* (Tabelle 16) und auf das Pflanzenwachstum von *Phaseolus aureus* L. (Tabelle 23) verwendet. Es wurde somit sowohl die Wirkung von NM-300K auf primär und sekundär Destruenten

(Bodenmikroorganismen, Kompostwurm), als auch auf Produzenten (Pflanze) für die Risikocharakterisierung betrachtet.

Es zeigte sich, dass die Nitrifikanten in der potentiellen Ammoniumoxidation am sensitivsten auf NM-300K reagierten. Es wurden eine NOEC von  $< 0,56$  mg/kg TM Boden und eine  $EC_{10}$  von 0,5 mg/kg TM Boden mit einem sehr engen 95% Vertrauensintervall von 0 – 1,0 mg/kg TM Boden berechnet (Tabelle 11). Die mikrobielle Biomasse wurde in einem vergleichbaren Maß durch NM-300K gehemmt, eine Wirkung auf die Regenwurm Reproduktion und auf das Pflanzenwachstum ergab sich erst ab höheren Bodengehalten.

#### **8.4 Durchführung der Risikocharakterisierung**

Aufgrund der fehlenden PEC wurde keine klassische Risikocharakterisierung durchgeführt. Stattdessen wurde zunächst die PNEC wie in Kapitel 8.1 beschrieben berechnet. Die Berechnung erfolgte auf Basis des Bodengehalts, bei dem einer der untersuchten Organismen am sensitivsten reagiert hatte. In diesem Fall waren dies die Nitrifikanten, bei denen sich eine  $EC_{10}$  zum Versuchsende nach 28 Tagen von 0,5 mg/kg TM Boden für NM-300K ergeben hatte. Der Charakterisierung lagen NOEC und  $EC_{10}$  Werte von mindestens drei Versuchen mit drei verschiedenen Organismen vor, wodurch sich ein Bewertungsfaktor von 10 ergab. Auf dieser Grundlage wurde eine PNEC im Boden von 0,05 mg/kg TM Boden für NM-300K berechnet.

Die berechnete PNEC wurde auf den Klärschlammfad übertragen. Auf Grundlage der AbfKlärV dürften über den Klärschlammfad 1,67 g TS Klärschlamm aufgebracht werden. Bei einer PNEC für Boden von 0,05 mg/kg TM Boden an NM-300K entspricht dies einem Gehalt von 30 mg/kg TS Klärschlamm für NM-300K.

Über einen Zeitraum von 200 Jahre würde es zu ca. 60 Ausbringungen an Klärschlamm auf die landwirtschaftlich genutzte Fläche kommen. Unter der Annahme, dass die Bioverfügbarkeit von Silber nicht zurückgeht, würde dies bedeuten, dass Klärschlamm nur dann auf die Fläche aufgebracht werden darf, wenn der Gehalt an Silber bei ca. 0,5 mg/kg TS Klärschlamm liegt.

## 9 Diskussion

### 9.1 Verbleib von Silbernanopartikeln in der Kläranlage

Im Rahmen der Promotion wurden vier Kläranlagensimulationen mit dem Ziel durchgeführt, die Wirkung und den Verbleib von NM-300K in der Kläranlage zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei umweltrelevanten Einlaufkonzentrationen über 90% des in die Laborkläranlage eingeleiteten NM-300K an den Klärschlamm adsorbiert.

Im Zusammenhang mit dieser Thematik zeigte sich in einer Studie von Tiede et al. (2010), dass in Batchversuchen mit Klärschlamm, nach sechs Stunden Kontaktzeit mehr als 90% der zugefügten Silbernanopartikel im Klärschlamm zu finden waren. Nur ca. 10% der Silbernanopartikel wurden in diesen Batchversuchen im Überstand gefunden. Hierbei wurden einmalig Konzentrationen an Silbernanopartikeln von 0,5 / 5 und 10 mg/L hinzugegeben, die Silbernanopartikel hatten eine Größe von 20 – 60 nm. Die Interaktion von Klärschlamm und Silbernanopartikeln wurde anhand der Ergebnisse damit erklärt, dass die Partikel an Klärschlamm sorbieren. Zusätzlich wurden Fällungsreaktionen der von Silbernanopartikeln gebildeten Silberionen mit Chlorid, Sulfid und mit organischem Material in Betracht gezogen.

Des Weiteren zeigten Kaegi et al. (2011) mit Silbernanopartikeln, vergleichbar mit NM-300K, in Modelkläranlagen, dass nach 43 Tagen Versuchsdauer nur 5% der Silbernanopartikel, die in die Denitrifikationsstufe eingeleitet wurden, im Abwasser wiederzufinden waren. 85% der Silbernanopartikel waren an den Klärschlamm sorbiert und weitere 5% waren nach wie vor in der Modelkläranlage zu finden. Die restlichen 5% der Silbernanopartikel wurden nicht wiedergefunden und fehlten in der Massenbilanz. Zu Beginn des Versuchs war die Sorption der Silbernanopartikel an den Klärschlamm mit 90% noch einmal größer. Eine Studie von Shafer et al. (1998), bei der allerdings Silber im allgemeinen und nicht speziell Silbernanopartikel betrachtet wurden, bekräftigt diese Ergebnisse. Hier wurde gezeigt, dass 92 – 99% der Einlaufkonzentration an Silber in der Kläranlage beseitigt wurden.

Auch in den Versuchen von Hou et al. (2012) und Yang et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass ca. 90% der verwendeten Silbernanopartikel im Klärschlamm lokalisiert waren. Hou et al. (2012) verwendeten dabei Partikel mit einer Größe von 23 nm (Messung am TEM), die mit Citrat stabilisiert wurden. Yang et al. (2012) wiederum

verwendeten Partikel mit einer Größe von 21 nm (Messung am TEM), die zur Stabilisierung von PVA umgeben waren. Eine weitere Studie von Wang et al. (2012) zum Verbleib von Silbernanopartikeln in der Kläranlage mit Hilfe einer Kläranlagensimulation belegt ebenfalls, dass der Großteil der Silbernanopartikel (88%) an den Klärschlamm adsorbiert. In dieser Studie wurde mit Silbernanopartikeln mit einem Carboxylcoating und eine Partikelgröße (in Wasser) von ca. 5 nm gearbeitet. Die Einlaufkonzentration lag hier bei 0,5 – 1,5 mg/L.

Die aufgeführten Studien bestätigen die Ergebnisse der Untersuchungen zum Verbleib von Silbernanopartikeln im Klärschlamm in dieser Arbeit. Silbernanopartikel, die in die Kläranlage gelangen, werden bei umweltrelevanten Konzentrationen zu über 90% an Klärschlamm adsorbiert. Die Sorption der Silbernanopartikel scheint dabei unabhängig von Dispersant, Stabilisator und Partikelgröße stattzufinden, wobei der Dispersant von NM-300K mit großer Wahrscheinlichkeit im Laufe des Versuchs abgebaut wird. Auf Basis dieser Ergebnisse muss darauf geschlossen werden, dass Silbernanopartikel über den Klärschlamm pfad auf landwirtschaftlich genutzt Flächen gelangen.

## **9.2 Wirkung und mögliche Transformationen von Silbernanopartikeln in der Kläranlage**

Neben dem Verbleib der Silbernanopartikel in der Kläranlage sollte zusätzlich untersucht werden, welche Faktoren die Wirkung von NM-300K auf die Mikroorganismen in der Kläranlage beeinflussen. Unter diesem Gesichtspunkt müssen auch mögliche Transformationen der Silbernanopartikel in Betracht gezogen werden. Die Versuche wurden mit einem Screening Versuch, dem Atmungshemmtest nach OECD Richtlinie 209 (1984), durchgeführt. Zusätzlich wird in diesem Kapitel die Wirkung von NM-300K aus den diversen Kläranlagensimulationen nach OECD Richtlinie 303A (2001) eingehend betrachtet.

### Atmungshemmtest ohne Modifikationen

Im Atmungshemmtest wurde eine  $EC_{50}$  für NM-300K von 43 - 67 mg/L bestimmt. Für  $AgNO_3$  lag die  $EC_{50}$  bei einer Konzentration von 2,1 – 2,7 mg/L. Es zeigte sich das  $AgNO_3$  im Atmungshemmtest wesentlich toxischer auf die Mikroorganismen des Klärschlammes wirkte als NM-300K.

Choi et al. (2008) untersuchten in ihrer Studie, die Wirkung von Silbernanopartikeln mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von  $14 \pm 6$  nm, AgCl Kolloiden (Größe  $0,25 \mu\text{m}$ ) und  $\text{AgNO}_3$  als Silberionenquelle auf das mikrobielle Wachstum in Klärschlamm. Die Silbernanopartikel waren zur Stabilisierung von PVA umgeben. Der Klärschlamm wurde in einem Reaktor mit anorganischem Medium kontinuierlich gewaschen, um die Konzentration an Chlorid und Sulfat gering zu halten. Die autotrophen Nitrifikanten wurden bei einer Konzentration von 1 mg/L durch die Silbernanopartikel mit  $86 \pm 3\%$  am stärksten gehemmt. Die Hemmung durch AgCl und  $\text{AgNO}_3$  lag bei  $46 \pm 4\%$  und  $42 \pm 7\%$ . Es zeigt sich, dass  $\text{AgNO}_3$  als Silberionenquelle eine vergleichbare Wirkung auf die Nitrifikanten hervorruft, wie in der vorliegenden Arbeit präsentierte Ergebnisse zum Atmungshemmtest mit NM-300K und  $\text{AgNO}_3$ . Das Silbernanopartikel war hingegen wesentlich toxischer für die Nitrifikanten im Vergleich zu NM-300K. Eine Erklärung für die unterschiedliche Wirkung der Silbernanopartikel stellt hierbei die Art der Versuchsdurchführung dar. Während bei Choi et al. (2008) mit gewaschenem Klärschlamm und angereicherten Nitrifikanten, die im Labor kultiviert wurden, gearbeitet wurde, wurde bei den Versuchen in den Kapiteln 5.7 und 5.8 mit frischem Klärschlamm gearbeitet, wodurch für die Silbernanopartikel mehr Liganden für potentielle Reaktionen zur Verfügung standen. Diese Annahme wird durch eine weitere Studie von Choi et al. (2009) gestützt, in der gezeigt wurde, dass eine geringe Menge an Sulfid die Wirkung der Silbernanopartikel um 80% reduzieren kann.

Auch Liang et al. (2010) zeigten in Batchversuchen mit einer Konzentration von 1 mg/L an Silbernanopartikeln und Silbernitrat, dass es zu einer Hemmung der Nitrifikation von 41,4% durch die Silbernanopartikel und von 13,5% durch Silbernitrat kommt. Die Silbernanopartikel, die hier verwendet wurden, hatten eine durchschnittliche Partikelgröße von 21 nm und ein PVA Coating. Auch bei Liang et al. (2010) wurde ähnlich wie bei Choi et al. (2008) der Klärschlamm zunächst gewaschen und somit von vorhandenen Liganden befreit. In diesem Fall wurde allerdings eine simulierte Kläranlage in Form eines modifizierten Ludzack-Ettinger Bioreaktor über 300 Tage betrieben. Klärschlamm aus einer kommunalen Kläranlage wurde über 300 Tage mit synthetischem Abwasser gefüttert und gewaschen. Dies führt ebenfalls zu einer Veränderung der ursprünglich im Klärschlamm vorhandenen Liganden und zu einer Veränderung der Toxizität der Silbernanopartikel.

Burkhardt et al. (2010) untersuchten die Wirkung von metallischen Silbernanopartikeln, Silbernitrat, partikulärem Silberchlorid und Mikrokomposit-Silber auf die Nitrifikationsleistung der Mikroorganismen des Klärschlammes in Batchreaktoren. Der Klärschlamm wurde in diesem Fall nicht vorbehandelt, so dass die ursprünglich vorhandenen Liganden nicht ausgewaschen wurden. Das metallische Silbernanopartikel war in diesem Versuch in Partikelgröße und Dispersant vergleichbar mit NM-300K. Es wurden Konzentrationen von 1 und 100 mg/L bei Expositionszeiten von zwei Stunden und sechs Tagen betrachtet. Keine der untersuchten Silberformen führte bei einer Konzentration von 1 mg/L zu einer Hemmung der Nitrifikationsleistung. Bei 100 mg/L führte das metallische Silbernanopartikel zu einer Hemmung der Nitrifikationsleistung von 90%, durch die Zugabe von Silbernitrat wurde die Nitrifikation vollständig unterbunden. Diese Ergebnisse stimmen mit den im Atmungshemmtest erzielten Ergebnissen mit NM-300K und auch Silbernitrat überein.

#### Kläranlagensimulationen

In der Kläranlagensimulation über 16 Tage zeigte sich für NM-300K, dass bei einer hohen Einlaufkonzentration von 16 mg/L die Umsetzung von Ammonium zu Nitrit nach 7 und 13 Tagen stark gehemmt wurde. Dies war in der Kläranlagensimulation zu Langzeitversuch 2 bei einer Einlaufkonzentration von 9 mg/L über einen vergleichbaren Zeitraum nicht zu beobachten. In allen darunter liegenden Einlaufkonzentrationen wurde die Umsetzung von Ammonium zu Nitrit und Nitrat nicht durch NM-300K beeinflusst. Die DOC-Elimination wurde ebenfalls nur in der Kläranlagensimulation mit einer Einlaufkonzentration von 16 mg/L beeinträchtigt. Von Versuchsstart bis Versuchstag 5 sank die DOC-Elimination von 90 auf 80% ab und stieg dann bis Versuchstag 16 wieder auf 94% an. In der Kläranlagensimulation mit  $\text{AgNO}_3$  über 10 Tage wurde am Versuchsende ebenfalls eine Hemmung der Umsetzung von Ammonium zu Nitrit bei der höchsten Einlaufkonzentration von 4 mg/L festgestellt. Die DOC-Elimination nahm in der Kläranlage mit einer Einlaufkonzentration von 4 mg/L kontinuierlich von 81% zu Beginn des Versuchs auf 52% nach 10 Tagen ab.

Die Ergebnisse aus der Kläranlagensimulation sind auf die des Atmungshemmtests übertragbar. Im Atmungshemmtest hatte sich gezeigt, dass die  $\text{EC}_{50}$  von NM-300K auf die Respiration der Mikroorganismen zwischen 43 – 67 mg/L lag. Diese

Konzentrationen in die Kläranlagen einzuleiten wäre nicht praktikabel gewesen und hätte keinerlei Bezug zu relevanten Umweltkonzentrationen gehabt. Daher wurde entschieden, die Einlaufkonzentration auf maximal 16 mg/L zu begrenzen. Nichtsdestotrotz zeigt sich für NM-300K und AgNO<sub>3</sub> in den beiden höchsten Einlaufkonzentrationen mit fortschreitendem Versuchsverlauf und einer Akkumulation von Silber im Klärschlamm, dass die Oxidation des Ammoniums und auch die DOC-Elimination gehemmt wurden. Die Hemmung der Oxidation von Ammonium deutet darauf hin, dass auch in der Kläranlagensimulation die Nitrifikanten durch NM-300K und AgNO<sub>3</sub> beeinflusst wurden.

Wang et al. (2012) untersuchten ebenfalls die Wirkung von Silbernanopartikeln auf die Mikroorganismen der Kläranlage. Hierbei wurden der chemische Sauerstoffbedarf im Abwasser und die Biomasseentwicklung, als Trockensubstanzgehalt, in der Kläranlage betrachtet. Die Silbernanopartikel besaßen ein Carboxylcoating und hatten eine durchschnittliche Partikelgröße in Wasser von ca. 5 nm und in Medium von ca. 30 nm. Die Einlaufkonzentration lag bei 0,5 – 1,5 mg/L. Es zeigte sich bei den Messungen des chemischen Sauerstoffbedarfs, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle festzustellen war. Lediglich bei der Bestimmung der Biomasse zeigte sich, dass zu Beginn der Versuche, bei der ersten Dosierung der Silbernanopartikel in die Anlage, der Trockensubstanzgehalt um 10 – 15% abnahm. Dieser Unterschied war im späteren Verlauf nicht mehr festzustellen. Bei Untersuchungen des Klärschlammes mit Transmissionselektronenmikroskop wurden einzelne Silbernanopartikel mit Partikelgrößen von 1 – 20 nm gefunden. Nach Aussage der Autoren hatten diese Silbernanopartikel eine vergleichbare Größe, Morphologie und Kristallstruktur wie jene, die in die Anlage dosiert wurden. Dies wird dahingehend interpretiert, dass die Silbernanopartikel keiner Transformation unterworfen waren sondern an Klärschlamm sorbiert vorlagen. Auch Hou et al. (2012) stellten über 15 Tage bei Einlaufkonzentrationen von 0,1 und 0,5 mg/L eine leichte Abnahme des Umsatzes von Ammonium zu Beginn der Versuche fest. Am Versuchsstart war der Umsatz an Ammonium des Abwassers in den Anlagen mit Silbernanopartikeln im Vergleich zur Kontrolle um 16% gehemmt. Ab dem zweiten Versuchstag war diese Hemmung nicht mehr zu beobachten. Hieraus folgerten Hou et al. (2012), dass es zu einer anfänglichen Hemmung der Nitrifikation kam. Die Sauerstoffzehrung wurde ebenfalls

bei einer Konzentration von 0,5 mg/L zu Beginn leicht gehemmt, regeneriert sich aber innerhalb von 24 Stunden wieder. Die Messungen des chemischen Sauerstoffbedarfs ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Anlagen in die Silbernanopartikel dosiert wurden.

Die Ergebnisse von Wang et al. (2012) und Hou et al. (2012) bestätigen die Ergebnisse aus Kapitel 5.8 und aus den Kläranlagensimulationen, die für die Langzeitversuche durchgeführt wurden. Bei Einlaufkonzentrationen von 0,04 - 4 mg/L wurde die Umwandlung von Ammonium über einen Versuchszeitraum von 10 Tagen nicht durch einen kontinuierlichen Zulauf an Silbernanopartikeln beeinflusst. In den beiden Studien wurde lediglich innerhalb der ersten 24 Stunden des Versuchs eine schwache Hemmung der Nitrifikanten festgestellt. Die Konzentration an Ammonium im Abwasser wurde innerhalb der ersten 24 Stunden des Versuchs in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt. Entsprechend können keine Rückschlüsse über eine Wirkung auf die Nitrifikanten unmittelbar nach der Zugabe der Silbernanopartikel getroffen werden. Der Trockensubstanzgehalt des Klärschlammes wies in den Kläranlagensimulationen nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede auf. Bei Wang et al. (2012) kam es zu einer schwachen Abnahme des TS-Gehaltes des Klärschlammes, die nach 24 Stunden nicht mehr festzustellen war. Aus der Summe der Ergebnisse kann geschlossen werden, dass der Einfluss von Silbernanopartikeln auf die Entwicklung des TS-Gehaltes des Klärschlammes vernachlässigbar ist.

In einer weiteren Studie zum Thema „Wirkung von Silbernanopartikeln in der Kläranlage“ untersuchten Liang et al. (2010) in einem modifizierten Ludzack-Ettinger Batchreaktor die Wirkung einer Zugabe an Silbernanopartikeln über 12 Stunden auf heterotrophe und autotrophe Mikroorganismen. Der Ludzack-Ettinger Batchreaktor umfasste eine Denitrifikation, Nitrifikation und ein Absetzbecken mit einem Gesamtvolumen von 7,2 Litern, vergleichbar mit den Laborkläranlagen, die für die Untersuchung von NM-300K genutzt wurden. Klärschlamm wurde für den Versuch aus einer kommunalen Kläranlage entnommen und in einer Vorlaufphase über 300 Tage kontinuierlich mit synthetischem Abwasser gefüttert. Nach einer kontinuierlichen Zugabe von Silbernanopartikeln über 12 Stunden wurde eine Konzentration an Silbernanopartikeln im Belebungsbecken von 0,75 mg/L gemessen, wobei nicht zwischen Abwasser und Klärschlamm unterschieden wurde. Es wurde ein Anstieg an Ammonium im Auslauf nach der Zugabe über 12 Stunden gemessen,

der darauf hin deutete, dass die Nitrifikation nach Beendigung der Zugabe gehemmt wurde. Innerhalb der ersten 16 Stunden nach der Zugabe der Silbernanopartikel kam es zu einer Erholung der Nitrifikationsleistung. Heterotrophe Bakterien, die für den Abbau organischer Substanzen verantwortlich sind, wurden nicht durch die Silbernanopartikel beeinflusst. Die autotrophen Nitrifikanten wurden hingegen beeinflusst und bilden die sensibelste Organismengruppe in der Kläranlage. Die Aktivität der autotrophen Nitrifikanten war auch nach mehr als 25 Tagen noch nicht vollständig wiederhergestellt. Eine Strukturanalyse der mikrobiellen Diversität im Klärschlamm zeigte einen Einbruch der Populationen von *Nitrosomonas* und *Nitrospira*, die für den Umsatz von Ammonium zu Nitrit verantwortlich sind. *Nitrobacter*, verantwortlich für den Umsatz von Nitrit zu Nitrat, war nach der Zugabe der Silbernanopartikel nicht mehr nachweisbar.

In zahlreichen Versuchen mit Kläranlagensimulationen wurde gezeigt, dass mit einer Zunahme der Versuchsdauer und Zugabe von synthetischem Abwasser, die Belastbarkeit der Mikroorganismen stetig sinkt. Die Mikroorganismen werden in diesen Simulationen lange mit synthetischem Abwasser gefüttert, das im Vergleich zu realen Einläufen sehr homogen ist. In diesem Fall ist von einer Verarmung der mikrobiellen Biodiversität auszugehen. Kommt es in diesem Fall zu einer Belastung der Mikroorganismen, so können die verbliebenen Arten sehr empfindlich reagieren. Hieraus folgt, dass weitere Untersuchungen mit Klärschlamm bei angedachter Umweltrelevanz möglichst mit einer kurzen Vorlaufphase und einer begrenzten Versuchsdauer von 10-15 Tagen (1 Schlammalter) durchgeführt werden sollten.

In der Studie von Kaegi et al. (2011) zum Verhalten von Silbernanopartikeln in der Kläranlage wurde zusätzlich gezeigt, dass die Silbernanopartikel mit einem signifikanten Anteil an Schwefel verbunden sind. Es kommt sowohl im Klärschlamm, als auch im Abwasser der Kläranlage zu einer nahezu kompletten Reaktion der Silbernanopartikel mit dem vorhandenen Schwefel zu  $\text{Ag}_2\text{S}$ . Die Bildung von  $\text{Ag}_2\text{S}$  geht dabei in der Denitrifikationsstufe in weniger als zwei Stunden vonstatten. Diese Ergebnisse werden durch eine Messung des Abwassers aus der Kläranlagensimulation zu Langzeitversuch 4 (Einlauf: 1,6 mg/L) bekräftigt. An der Universität Göteborg wurde das Abwasser mit einer Single Particle ICP-MS untersucht und es konnte  $\text{Ag}_2\text{S}$  nachgewiesen werden. Aufgrund der schwachen Datenlage (lediglich eine Messung wurde durchgeführt) wurden diese Ergebnisse

nicht dargestellt. Die Annahme wird durch Kim et al. (2010) bekräftigt, in deren Studie Klärschlamm aus einer Großstadtregion methodisch untersucht wurde. Dabei zeigte sich die Bildung von ellipsenförmigen  $\text{Ag}_2\text{S}$  Kristallen in Klärschlamm, die Partikelgröße von 5 – 20 nm vorwies und sehr kleine, lockere Aggregate bildeten. Der untersuchte Klärschlamm hatte einen Ag-Gehalt von 856 mg/kg TS Klärschlamm.

Bevor Klärschlamm auf landwirtschaftliche Flächen ausgebracht wird, wird er einer Vorbehandlung unterzogen. Neben der Entwässerung findet eine aerobe Lagerung oder eine anaerobe Klärschlammfäulung je nach Management der Kläranlage statt. In der vorliegenden Arbeit wurden Hinweise darauf gewonnen, dass die Klärschlammvorbehandlung einen Einfluss auf das langfristige Verhalten von Silbernanopartikeln haben kann. In der Literatur wurde dieses Thema bislang nicht aufgegriffen.

#### Atmungshemmtest mit Modifikationen

Der größte Einfluss auf die Wirkung von NM-300K in dieser Testreihe zeigte sich bei der Veränderung der Zusammensetzung des synthetischen Abwassers. Das in den Versuchen genutzte synthetische Abwasser besteht sowohl aus organischen Komponenten wie Pepton, Harnstoff und Fleischextrakt, als auch aus einer Vielzahl an Salzen. Bei einer Halbierung der Konzentration der Inhaltsstoffe stieg die Hemmung auf die Respiration der Mikroorganismen bei einer Konzentration von 50 mg/L leicht von 60% auf 72% an. Diese Hemmung war bei einer Erhöhung der Konzentration der Inhaltsstoffe um das 10fache nicht zu beobachten. In diesem Fall lag die Respirationsrate auf Kontrollniveau. Diese Abnahme der Toxizität von NM-300K bei steigender Konzentration der Inhaltsstoffe kann auf verschiedene Gründe zurückgeführt werden.

Choi et al. (2009) untersuchten die Veränderung der Toxizität von Silbernanopartikeln auf die Nitrifikanten im Klärschlamm unter Anwesenheit verschiedener Liganden ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  und  $\text{EDTA}^-$ ). Dabei zeigte sich, dass Sulfid den einzigen Ligand darstellt, der die Wirkung der Silbernanopartikel effektiv reduziert. Mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops gekoppelt mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie wurde gezeigt, dass die Silbernanopartikel mit Sulfid reagieren und  $\text{Ag}_x\text{S}_y$  Komplexe bilden. Das synthetische Abwasser, das im

Atmungshemmtest genutzt wird, kann als Quelle für Schwefel dienen. Eine Reaktion von Schwefel bzw. Sulfid mit NM-300K würde die Abnahme der Toxizität bei 10fach konzentriertem synthetischem Abwasser erklären. Dabei belegen Liu et al. (2011) ebenfalls, dass Silbernanopartikel mit verschiedenen Schwefelquellen wie  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{HS}^-$  zu  $\text{Ag}_2\text{S}$  Nanokristallen reagieren können. Zur Reaktion der Silbernanopartikel mit Schwefelquellen wird gelöster Sauerstoff benötigt. Die Reaktion ist abhängig von pH-Veränderungen und dem Gehalt an organischer Substanz die vorhanden ist. Zusätzlich ist die Bildung von  $\text{Ag}_2\text{S}$  abhängig von der vorhandenen Konzentration an Sulfid. In diesem Zusammenhang zeigen Levard et al. (2011), dass sich mit fortschreitender Sulfidierung die Auflösungsrate der Silbernanopartikel und somit die Bildung von Silberionen senkt, was gleichzeitig zu einer Abnahme der Toxizität der Silbernanopartikel führen kann. Auch die Ladung der Partikel kann sich durch die fortschreitende Reaktion mit Schwefel verändern. Aus diesen Erkenntnissen kommen Levard et al. (2011) zu dem Schluss, dass sich durch die Reaktion der Silbernanopartikel mit Schwefel deren Reaktivität genauso verändern kann wie der Transport und die Toxizität in Boden. Vergleichbare Aussagen finden sich auch bei Lowry et al. (2012). Hier wird beschrieben, dass die Auflösung der Silbernanopartikel und die Sulfidierung wichtige Prozesse darstellen, die die Oberflächeneigenschaften, die Toxizität und die Persistenz in Boden beeinflussen. Dies trifft vor allem auf metallische Nanomaterialien wie z.B. Silber, Zink und Kupfer zu, da diese teilweise lösliche Metalloxide bilden und eine starke Affinität für anorganische und organische Sulfidliganden haben.

Weder eine Veränderung des pH-Wertes noch der Zusatz von Waschwasser oder verschiedenen Komplexbildnern beeinflusste die Toxizität von NM-300K auf die Mikroorganismen des Klärschlammes in vergleichbarer Weise wie eine Modifikation des synthetischen Abwassers. Bei einer sehr hohen Konzentration (100 mg/L) des Komplexbildners NTA wurde keine Wirkung von  $\text{AgNO}_3$  auf die Respirationsrate festgestellt. Der Zusatz des Komplexbildners Calgon und auch der Zusatz von Waschwasser, in dem ebenfalls ein Komplexbildner enthalten war, führten zu keiner Veränderung der Wirkung von NM-300K. Bei der Veränderung des pH-Wertes zeigte sich, dass die Zugabe von Klärschlamm einen konstanten pH-Wert von 6 / 7 oder 8 im Testsystem über den Versuchszeitraum von drei Stunden nicht zulässt. Es kommt zu einer Anpassung des pH-Wertes, so dass sich ändernde Effekte nicht zu erwarten

sind. In den durchgeführten Versuchen zeigten sich letztlich auch keine signifikanten Unterschiede in den Versuchen mit einem veränderten pH-Wert.

Geranio et al. (2009) zeigten in Zusammenhang mit dieser Thematik, dass mit steigendem pH-Wert bzw. bei Konditionen, die dem eines Waschvorgangs entsprechen (pH 10), die Auflösung der Silbernanopartikel um das 10fache im Vergleich zu pH 7 reduziert wird. Eine steigende Auflösung der Silbernanopartikel bei einem pH-Wert von 8 oder im sauren Bereich bei pH 6 wäre in den Versuchen mit NM-300K aufgrund der sofortigen Reaktion der Silbernanopartikel mit verschiedenen Liganden wie Sulfid oder Chlorid nicht festzustellen. Die Zugabe von synthetischem Abwasser in das Testsystem erhöht den Gehalt an Sulfid und Chlorid, zusätzlich wird der Klärschlamm vor dem Versuch nur einmal gewaschen, wodurch Sulfid- und Chloridquellen von Beginn an in dem Klärschlamm vorhanden sind. Des Weiteren wurde in dem Versuch mit Waschwasser, mit einem ursprünglichen pH von 11, nur eine geringe Menge (10 mL) des Waschwassers, aus der Waschflotte der Hohenstein Institute, in das Testsystem gegeben. Auf diesem Weg wurde eine Wirkung auf die Respirationsrate der Mikroorganismen des Klärschlammes durch einen pH-Wert im alkalischen Bereich vermieden.

Zusätzlich zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Abwasserkomponenten auf die Wirkung von Silbernanopartikeln war es auch wichtig, die Wirkweise von Silbernanopartikeln zu untersuchen, die wegen ihrer antimikrobiellen Wirkung auf Textilien aufgetragen oder eingearbeitet wurden. Hierzu wurden verschiedene Faserproben bezogen, die im Atmungshemmtest untersucht wurden. Dabei zeigte sich eindeutig, dass eine Wirkung nur bei einem direkten Kontakt zwischen Fasern, in die Silbernanopartikel eingearbeitet wurden, und Mikroorganismen verursacht wurde.

Bei Lorenz et al. (2012) wurde die antibakterielle Wirkung von acht verschiedenen Textilien, die unter anderem mit Silbernanopartikeln ausgestattet waren, auf das Wachstum des Gram-Bakteriums *Klebsiella pneumoniae* untersucht. Dabei zeigten die Textilien, ausgestattet mit Silbernanopartikeln, die größte antibakterielle Wirkung, während bei Textilien mit niedrigen Silbergehalten und Silberdraht, sogenanntem „silver wire“, keine antibakterielle Wirkung festzustellen war. In dieser Arbeit wurde ebenso gezeigt, dass nur bei einem von acht Textilien metallische Silbernanopartikel

zu finden waren, während bei den weiteren Textilien z.B. AgCl Nanopartikel, AgNP Sulfid oder auch größere AgCl Partikel aus den Textilien freigesetzt wurden.

Für die Atmungshemmtests mit NM-300K und AgNO<sub>3</sub> mit verschiedenen Fasern wurden die Silberkonzentrationen im Medium nicht bestimmt. Nachdem die Fasern in dem Versuch mit direktem Kontakt 24 Stunden gerührt hatten, wurde zunächst das synthetische Abwasser in die Testgefäße gegeben. Erst danach erfolgte die Zugabe des Klärschlammes. Durch die vorherige Zugabe des synthetischen Abwassers ist es wahrscheinlich, dass freigesetzte Silbernanopartikel oder Silberionen vorher mit den zugefügten Liganden des synthetischen Abwassers reagiert haben. Aus diesem Grund war nach der Zugabe des Klärschlammes und dem damit verbundenen Eintrag weiterer Liganden keine Toxizität mehr festzustellen. Im zweiten Versuch mit direktem Kontakt der Fasern zeigte sich eine starke Hemmung bei verschiedenen silbernanopartikelhaltigen Fasern, selbst bei niedrigen Gehalten an Silber auf der Faser. Hier kommt es wahrscheinlich zu einer kontinuierlichen Freisetzung an Silbernanopartikeln oder Silberionen und damit verbunden zu einer hemmenden Wirkung auf die Respiration der Mikroorganismen.

### Schlussfolgerung

Die Ergebnisse, die sowohl im Atmungshemmtest (OECD Richtlinie 209) als auch in den Kläranlagensimulationen (OECD Richtlinie 303 A) mit NM-300K und Silbernitrat erzielt wurden, deuten an, dass eine Wirkung, die im Screening Versuch erzielt wurde, auch auf die Kläranlage übertragbar ist. Eine Kläranlagensimulation bietet wesentlich größere Untersuchungsmöglichkeiten, dennoch kann anhand des Atmungshemmtests eine erste Einschätzung der Wirkung von verschiedenen Nanopartikeln vorgenommen werden. Es muss allerdings genau bedacht werden, was untersucht werden soll, denn bei einer Kläranlagensimulation wird kontinuierlich synthetisches Abwasser eingeleitet, das mit fortschreitender Versuchsdauer die mikrobielle Biodiversität aufgrund des homogen zusammengesetzten Abwassers reduziert und je nach Zusammensetzung auch zu einer Verminderung möglicher Liganden wie Sulfid oder Chlorid führen kann. Auf diese Weise kann es zu einer veränderten Toxizität der Silbernanopartikel kommen, wie verschiedene Studien zur Wirkung von Silbernanopartikeln und Silbernitrat auf gewaschenen, angereicherten Klärschlamm zeigen. In diesem Fall wirken die Silbernanopartikel stärker als

Silbernitrat, während bei dem umweltrelevanteren Szenario mit ungewaschenem Klärschlamm Silbernitrat die Mikroorganismen stärker beeinflusst.

In diesem Zusammenhang muss die Erneuerung der OECD Richtlinie 209 zur Durchführung des Atmungshemmtests kritisch gesehen werden. Die Durchführung nach der novellierten Richtlinie bedeutet, dass der Klärschlamm stark aufgereinigt wird, wodurch vorhandene Liganden verloren gehen und Testsubstanzen eine stärkere Toxizität auf die Mikroorganismen hervorrufen können. Entsprechend der Fragestellung sollte entschieden werden, wie der Versuch letztlich durchzuführen ist.

Die Dosierung von Silbernanopartikeln zusammen mit dem synthetischen Abwasser in die Kläranlagensimulationen gewährleistet, dass die Silbernanopartikel mit möglichen Liganden reagieren und das Szenario somit einen möglichst großen Umweltbezug hat. Diese Art der Dosierung wurde zur kontinuierlichen Kontamination von Klärschlamm mit Nanosilberpartikeln vor den anschließenden Langzeitversuchen durchgeführt, wodurch die Langzeitversuche ein sehr realistisches Nutzungsszenario darstellen, das auf diese Art und Weise noch nicht untersucht wurde.

### 9.3 Grunddatensatz zur Wirkung von NM-300K

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse, die in den Kapiteln 5 und 7 erzielt wurden und auf deren Basis die Risikocharakterisierung angefertigt werden sollte, mit anderen Studien verglichen.

In den Versuchen mit NM-300K hat sich gezeigt, dass die OECD und ISO Richtlinien ohne Probleme für die Untersuchung der Nanomaterialien angewendet werden konnten. Lediglich die Frage der Applikation sollte im Vorfeld, in Abhängigkeit davon ob das Nanopartikel als Pulver oder Dispersion vorliegt, geklärt werden. Einen guten Anhaltspunkt hierzu liefert eine Veröffentlichung von Hund-Rinke et al. (2012) zur Applikation von Nanomaterialien in ökotoxikologischen Versuchen mit Boden.

In einem Review von Tourinho et al. (2012) wird angeführt, dass es derzeit nur wenige Informationen zu Verhalten und Wirkung von Nanopartikeln in Boden und aquatischem Sediment gibt. In diesem Review werden einige Daten zur Wirkung von Silbernanopartikeln auf verschiedene Invertebraten zusammengetragen. Hierbei handelt es sich um Studien zur Wirkung von Silbernanopartikeln auf *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* und auch den Nematoden *Caenorhabditis elegans*, dessen Lebensraum das Bodenporenwasser darstellt. Versuche mit *C. elegans* werden

allerdings in flüssigem Medium gemacht, wodurch auftretende Wirkungen schwerer auf jene die im Boden ermittelt wurden zu beziehen sind. Handy et al. (2012) empfehlen, auch diesen Organismus mit zu betrachten, da die Versuchsdauer wesentlich kürzer ist als z.B. bei einem Reproduktionstest mit *Eisenia andrei*, der Versuch leicht durchzuführen ist und die Sensitivität der ursprünglichen Endpunkte gesteigert wird. Entsprechend wurden auch Ergebnisse aus Versuchen mit *C. elegans* der Diskussion der Ergebnisse des Regenwurm Reproduktionstests mit *Eisenia andrei* beigefügt. Im Laufe der Literaturrecherche zu diesem Kapitel zeigte sich zusätzlich, dass es eine Fülle an Studien zur Wirkung und zum Verhalten reiner Silbernanopartikel im aquatischen Bereich, aber auch in Kläranlagen und auf die Mikroorganismen des Klärschlammes gibt. Die Wirkung auf die Mikroorganismen des Bodens wurde hingegen nur in wenigen Studien untersucht. Die Fragestellung wie sich reine Silbernanopartikel auf das Pflanzenwachstum auswirken, wird hauptsächlich auf Basis von Versuchen mit Hydrokulturen betrachtet. Dabei zeigt sich, dass die in diesen Studien erzielten Ergebnisse sich stark von jenen, die mit Boden oder künstlichem Substrat angefertigt wurden, unterscheiden. Dies kann auf eine je nach Umgebungsmedium veränderte Bioverfügbarkeit, welche in flüssigen Medien zumeist höher ist, zurückgeführt werden.

Diese Lücken, vor allem im Bereich der Wirkung von Silbernanopartikeln auf die Mikroorganismen des Bodens und auf das Pflanzenwachstum, galt es mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu schließen. Auch im Bereich der Invertebraten sollten durch den Einsatz von DGTs und der Untersuchung der Akkumulation von Silbernanopartikel unter anderem Lösungen zur Fragestellung der Wirkmechanismen von Silbernanopartikeln geliefert werden.

Die Risikocharakterisierung, die das Hauptziel dieser Arbeit darstellte, sollte für den Klärschlammfad angefertigt werden. Es ist wichtig, für die Risikocharakterisierung bedeutende Transformationsprozesse und Veränderungen der Nanopartikel z.B. in Kläranlagen mit zu betrachten (Nowack et al. 2012). Die Auswirkung dieser Transformationsprozesse in Kläranlagen und im Boden auf die Wirkung von NM-300K und auch von  $\text{AgNO}_3$  wurde schließlich in den dargestellten Langzeitversuchen untersucht. Auf Basis der Ergebnisse zur Wirkung von reinem NM-300K und denen, die mit NM-300K in den Langzeitversuchen erzielt wurden, wurde die Risikocharakterisierung für den Klärschlammfad erstellt.

### Vorversuche

Es wurde eine Wiederfindung an Silbernanopartikeln und Silbernitrat in dem Versuchsboden RefeSol 01A in einem Regenwurm Reproduktionstest bei einem niedrigen (15 mg/kg TM Boden) und einem hohen Bodengehalt (120 mg/kg TM Boden) von 90% erzielt. Diese Versuchsdauer stellt die längste in den durchgeführten Versuchen dar. Die Versuche zur Wirkung auf Mikroorganismen hatten eine maximale Dauer von 28 Tagen, die Versuche zum Pflanzenwachstum von 14 Tagen. Basierend auf dem „Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology“ darf der nominale Gehalt zum Ausdruck der Toxizität von Substanzen genutzt werden, wenn der gemessene Gehalt mehr als 80% des nominalen Gehaltes entspricht. Diese Richtlinie gilt für die aquatische Ökotoxikologie, da es aber im Bereich der Terrestrik keine vergleichbare Richtlinie gibt, wurde die Richtlinie der Aquatik angewandt. In den Langzeitversuchen wurden jeweils an zwei verschiedenen Tagen an unterschiedlichen Stellen sechs Proben aus den Versuchsgefäßen entnommen und auf den Silbergehalt untersucht. Hier wurden nominale Bodengehalte zur Bestimmung der Wirkung von Silbernanopartikeln genutzt.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich der Dispersant NM-300K DIS im Boden verhält. Hierzu wurde der manometrische Respirationstest durchgeführt, in dem gezeigt wurde, dass der Dispersant innerhalb von 28 Tagen fast vollständig (~92%) abgebaut wurde. Schon nach 14 Tagen (Versuchsdauer eines Pflanzenwachstumstest) war der Dispersant zu ca. 76% abgebaut. Auch wenn dieser Versuch mit Mikroorganismen des Klärschlammes und in wässrigem Milieu durchgeführt wurde, kann aus dem Ergebnis darauf geschlossen werden, dass auch in Boden der Dispersant abgebaut wird. Eine Studie von Badawy et al. (2010) zeigt, dass der Dispersant einen großen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Silbernanopartikel hat und dass Transport und Verhalten der Silbernanopartikel stark von dem Verhalten des Dispersanten abhängen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse muss im Folgenden davon ausgegangen werden, dass der Dispersant sowohl in den Versuchen über 14 Tage (Pflanzentest) als auch 56 Tage (Regenwurm Reproduktion), aber auch in den Langzeitversuchen zum Großteil abgebaut wurde.

### Mikroorganismen

In den Versuchen zur Wirkung von reinem NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  auf die Mikroorganismen des Bodens, die primären Destruenten, zeigte sich, dass vor allem NM-300K eine hohe toxische Wirkung hat. Die Nitrifikanten stellten den sensitivsten Organismus bei Versuchen über 28 Tage dar. Es ergab sich eine NOEC für NM-300K von  $< 0,56$  mg/kg TM Boden und eine  $\text{EC}_{10}$  von  $0,5$  mg/kg TM Boden, die Wirkung von  $\text{AgNO}_3$  lag in einem vergleichbaren Bereich. Auch die mikrobielle Biomasse wurde über 28 Tagen in einem vergleichbaren Bereich an Bodengehalten durch NM-300K gehemmt. Hier wurde eine NOEC von  $1,67$  mg/kg TM Boden und eine  $\text{EC}_{10}$  von  $1,0$  mg/kg TM Boden für NM-300K berechnet, während durch  $\text{AgNO}_3$  keine Wirkung mehr hervorgerufen wurde. In den Langzeitversuchen zeigte sich, dass nach 60 – 140 Tagen eine Wirkung durch NM-300K ab einem Bodengehalt von ca.  $1,4$  mg/kg TM Boden auf die Nitrifikanten und auf die mikrobielle Biomasse zu verzeichnen war. Die Ergebnisse mit  $\text{AgNO}_3$  waren vergleichbar. Die Untersuchungen zur mikrobiellen Bodendiversität zu verschiedenen Zeitpunkten der Langzeitversuche zeigen, dass vor allem der Stickstoffkreislauf durch NM-300K beeinflusst wird.

Hänsch und Emmerling (2010) untersuchten die Wirkung von Silbernanopartikeln auf die mikrobielle Biomasse und Aktivität sowie auf die Enzymaktivität im Boden (mikrobielle Bodendiversität) über 120 Tage. In den Versuchen wurde ein kommerziell erhältliches Nanosilberspray untersucht, welches zur Steigerung des Pflanzenwachstums genutzt wird. Genaue Daten über die Partikelgröße, Coatings oder eventuelle Zusatzstoffe wurden nicht aufgeführt. Es wurden Bodengehalte von  $3,2$ ,  $32$  und  $320$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  TM Boden untersucht. Aufgrund der fehlenden Informationen zu den Eigenschaften der Silbernanopartikel gestaltet sich ein Vergleich der Ergebnisse schwierig. Nichtsdestotrotz zeigt sich, dass die Bodengehalte bei denen eine Wirkung hervorgerufen wird in der Studie mit Nanosilberspray und bei den Versuchen mit NM-300K auf einem Niveau liegt. Die mikrobielle Biomasse war mit steigendem Bodengehalt an Nanosilberspray signifikant gehemmt, während die Basalatmung gleichzeitig mit steigendem Bodengehalt stimuliert wurde. In dieser Studie wurde die mikrobielle Biomasse bei einem Bodengehalt von  $0,32$  mg/kg um ca. 50% gehemmt. Dieser Bodengehalt ist vergleichbar mit dem  $\text{EC}_{50}$  aus den Versuchen mit reinem NM-300K und auch mit den Ergebnissen der

Langzeitversuche. Die mikrobielle Bodendiversität bzw. Enzymaktivität wurde über 120 Tage nicht signifikant beeinflusst. Lediglich bei dem Enzym AMC-Leucin zeigte sich ein schwacher, nicht signifikanter Unterschied zwischen Tag 0 und 14, was darauf hindeutet, dass dieses Enzym am sensitivsten zu sein scheint. Dies zeigen auch die Messungen der mikrobiellen Bodendiversität die während der Langzeitversuche durchgeführt wurden.

Bei Shin et al. (2012) wurde eine Hemmung durch Silbernanopartikel auf die Aktivität von Bodenenzymen festgestellt. Dabei wurden vier Bodenenzyme aus dem Nährstoffkreislauf, z.B. die Urease und zwei Bodenenzyme zur Darstellung der allgemeinen mikrobiellen Aktivität z.B. die Dehydrogenase untersucht. Es wurden Citrat stabilisierte Silbernanopartikel mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 9,9 nm, gemessen mit TEM, betrachtet. Die Enzymaktivität wurde an Tag 0, 1 und 7 bestimmt. Es wurden Bodengehalte von 1, 10, 100 und 1000 mg/kg TM für die Silbernanopartikel und 0,035 / 0,175 / 0,525 / 1,0 und 1,5 mg/kg TM Boden für Silberionen ( $\text{AgNO}_3$ ) getestet. Die Bodengehalte für  $\text{AgNO}_3$  wurden in Vorversuchen ermittelt und entsprachen der Konzentration an Silberionen, die durch die Silbernanopartikel durch Auflösung freigesetzt wurden. Anhand dieser Versuche zeigte sich, dass vor allem die Aktivität der Urease schon ab einem Bodengehalt an Silbernanopartikeln von 1 mg/kg TM Boden stark vermindert war. Auch die Aktivität der anderen untersuchten Enzyme wurde durch die Silbernanopartikel gehemmt. Hier ergaben sich Hemmungen teilweise ab 10 mg/kg TM Boden (Dehydrogenase) ansonsten ab 100 mg/kg TM Boden. Auftretende Effekte an Versuchstag 0 verstärkten sich bis zu Versuchstag 7. Aus der starken Hemmung der Urease wurde geschlossen, dass der Stickstoffkreislauf im Boden stark durch die Silbernanopartikel beeinflusst wurde (Shin et al. 2012). Diese Ergebnisse passen sehr gut zu den Erkenntnissen, die in den Versuchen mit Nitrifikanten (Potentiellen Ammoniumoxidation) beobachtet wurden. Die Nitrifikanten scheinen die Mikroorganismengruppe darzustellen, die am sensitivsten auf Silbernanopartikel reagiert. Auch in den Langzeitversuchen zeigte sich bei den Untersuchungen zur Enzymaktivität, dass eine Wirkung von NM-300K hauptsächlich auf den Stickstoffkreislauf festzustellen war. In diesem Zusammenhang zeigte eine weitere Studie, dass Silberionen Enzyme des Phosphor-, Schwefel- und Stickstoffkreislaufes von Nitrifikanten hemmt (Ratte 1999).

Derzeit gibt es nur sehr wenige Studien zum Verhalten von Silbernanopartikel auf die Mikroorganismen im Boden. Bei den drei angeführten Studien, zeigt sich, dass die Ergebnisse mit denen, die mit NM-300K erzielt wurden, vergleichbar sind.

### Pflanzentest

Mit Hilfe des Pflanzentests wurde die Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> auf die Gruppe der Produzenten, in diesem Fall auf *Phaseolus aureus* L. (Bohne) und *Avena sativa* L. (Hafer) untersucht. Zusätzlich wurden Pflanzentests auch während der Langzeitversuche mit *Phaseolus aureus* L. durchgeführt.

In den Versuchen mit reinem NM-300K bzw. mit AgNO<sub>3</sub> wurde festgestellt, dass die Bohne sensitiver als Hafer auf NM-300K reagiert. Es ergab sich für NM-300K und AgNO<sub>3</sub> eine NOEC von 1,5 mg/kg TM Boden auf das Pflanzenwachstum der Bohne. Die Hemmung in den Langzeitversuchen nach 100 – 180 Tagen durch NM-300K auf das Pflanzenwachstum von *Phaseolus aureus* L. war vergleichbar. Die in Kapitel 7.1.5 dargestellten Messungen des Silbergehaltes in Wurzel, Spross und Blättern deuten an, dass Silber im Boden nach 140 Tagen frei verfügbar ist, über die Wurzeln aufgenommen und dann in der Pflanze weiter transportiert wird.

Der Vergleich vieler Studien zur Wirkung von Silbernanopartikeln auf das Wachstum verschiedener Pflanzen als Stellvertreterorganismus für die Produzenten wird durch verschiedene Versuchsmedien erschwert. In einer Studie von Lee et al. (2012) wurde der Einfluss verschiedener Medien auf die Phytotoxizität von Silbernanopartikeln auf *Phaseolus radiatus* L. und *Sorghum bicolor* L. untersucht. Dabei wurden die Untersuchungen sowohl auf Agar, als auch in künstlichem Testsubstrat, hergestellt gemäß der OECD Richtlinie, mit Citrat-stabilisierten Silbernanopartikeln mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 10 nm durchgeführt. Im Versuch mit Agar wurden Konzentrationen von 5, 10, 20 und 40 mg/L, in dem mit Versuchsboden 100, 300, 500, 1000 und 2000 mg/kg TM Boden untersucht. Das Wachstum der Sämlinge wurde durch die Silbernanopartikel in den Versuchen mit Agar bei beiden Pflanzen schon bei einer Konzentration von 5 mg/L signifikant gehemmt und es zeigten sich Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen. Die Versuche mit künstlichem Testsubstrat hingegen ergaben, dass nur das Wachstum der Sämlinge von *Sorghum bicolor* L. durch die Silbernanopartikel signifikant gehemmt wurde. Die Wachstumsrate von *Phaseolus radiatus* L. wurde nicht beeinflusst, obwohl Bodengehalte von bis zu 2000

mg/kg TM Boden untersucht wurden. Dies steht im direkten Gegensatz zu den Ergebnissen der Wirkung von NM-300K auf *Phaseolus aureus* L. Hier zeigte sich unter anderem auch bei sehr niedrigen Bodengehalten eine Hemmung des Pflanzenwachstums. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse liefern hierbei die unterschiedlichen Versuchsböden (künstliches Testsubstrat und natürlicher Boden), aber auch die unterschiedlichen Pflanzen. Auch die Wirkung von Silberionen wurde untersucht und es zeigte sich, dass in den Versuchen auf Agar die Entwicklung der Pflanzen wesentlich stärker beeinflusst wurde, als in den Versuchen mit künstlichem Testsubstrat. Aus diesen Ergebnissen wurde letztlich die Schlussfolgerung gezogen, dass die Verfügbarkeit der Silbernanopartikel in Boden reduziert wurde, und dass die Untersuchung der Phytotoxizität von Nanopartikeln in Boden wichtige Informationen zur Bioverfügbarkeit liefert.

In einer anderen Studie von El-Temsah und Joner (2012) wurde die Wirkung von Eisen- und Silbernanopartikeln auf die Keimung von *Linum usitatissimum* L., *Lolium perenne* L. und *Hordeum vulgare* L. betrachtet. Ebenso wurde die Bioverfügbarkeit bei Exposition über eine Suspension und über Boden untersucht. Diese Versuche wurden mit zwei natürlichen Böden und auf Filterpapier durchgeführt, wobei die Wirkung und Bioverfügbarkeit der Silbernanopartikel lediglich auf Filterpapier getestet wurde. Es wurden drei verschiedene Silbernanopartikel mit Partikelgrößen von 1 – 20 nm untersucht. In den Versuchen zeigte sich, dass die Silbernanopartikel mit der kleinsten Partikelgröße bei einer Konzentration von 10 mg/L die Keimung von *Lolium perenne* L. und die beiden größeren Silbernanopartikel (5 und 20 nm) die Keimung von *Hordeum vulgare* L. bei 10 mg/L hemmten. Eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ergab sich bei keiner der untersuchten Pflanzen und die Keimung wurde auch bis zu einer Konzentration von 100 mg/L nicht komplett unterbunden (El-Temsah und Joner 2012). Die Ergebnisse aus Kapitel 5.6 und den Langzeitversuchen sind mit diesen Ergebnissen vergleichbar. Auch in den Versuchen mit *Phaseolus aureus* L. und *Avena sativa* L. wurde die Keimung nicht signifikant durch die Silbernanopartikel beeinflusst.

Yin et al. (2012) untersuchten die Effekte von Silbernanopartikeln auf die Keimung und das frühe Pflanzenwachstum bei 11 Pflanzen aus Feuchtgebieten. Dabei wurde die Wirkung der Silbernanopartikel auf das Wachstum in Medium und zum anderen in natürlichem Boden untersucht. Bei dem Versuch mit natürlichem Boden wurden

die Pflanzen nicht einzeln untersucht, stattdessen wurde die komplette Pflanzengesellschaft, bestehend aus 11 Pflanzen betrachtet. Es wurden zwei verschiedene Silbernanopartikel mit Partikelgrößen von 20 nm (PVP coating), 6 nm (gum arabic coating) und Silbernitrat bei Konzentrationen von 1, 10 und 40 mg/L untersucht. In den Versuchen mit Medium hatten die 20 nm Silbernanopartikel keinen Effekt auf die Keimung. Bei einer Konzentration von 40 mg/L führten die 6 nm Partikel bei drei Pflanzen zu einer schwächeren und bei einer Pflanze zu einer stärkeren Keimung, und Silbernitrat steigerte die Keimung bei fünf Pflanzen. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen, die in dieser Arbeit mit *Phaseolus aureus* L. und *Avena sativa* L. erzielt wurden, gestaltet sich äußerst schwierig. Die Keimung wurde in keinem der Versuche durch NM-300K beeinflusst, eine Wirkung wurde sowohl bei niedrigen als auch bei höheren Bodengehalten festgestellt. In allen Versuchen mit *Phaseolus aureus* L. und *Avena sativa* L. lag die  $EC_{25}$  bei Bodengehalten von 11 – 43 mg/kg TM Boden an NM-300K, was der Konzentration, in der eine Wirkung in den Versuchen von Yin et al. detektiert wurde (40 mg/L), entspricht. Die Wirkung variierte allerdings je nach Pflanze zwischen einer Hemmung und einer Stimulation. Generell zeigte sich, dass das Wurzelwachstum stärker beeinflusst wurde als das Wachstum von Spross und Blättern. Die Effekte, die sich in den Versuchen mit Medium gezeigt hatten, waren bei den Versuchen mit natürlichem Boden weniger stark ausgeprägt, generell aber übertragbar. Auch in dieser Studie zeigt sich, dass die Untersuchungen mit natürlichem Boden zu einer veränderten Wirkung führen.

Ein Vergleich mit anderen Studien zur Wirkung von Silbernanopartikeln auf das Pflanzenwachstum wird dadurch erschwert, dass Versuche zum Großteil mit Hydrokulturen oder auf Filterpapier durchgeführt wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Umgebungsmedien (Nährmedium; destilliertes Wasser oder Boden) gestaltet es sich schwierig, auftretende Effekte zu vergleichen. In einem Review beschreiben Ma et al. (2010), dass es schon ab sehr geringen Konzentrationen von 1 mg/L zu einer toxischen Wirkung der verwendeten Silbernanopartikel mit Partikelgrößen von 20 – 80 nm auf die Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* L. kommt. Die Wurzelspitze färbte sich dabei leicht braun, was auf eine Adsorption der Silbernanopartikel zurückgeführt wurde. Zusätzlich wird beschrieben, dass sich in Versuchen andeutet, dass Silbernanopartikel mit einer

Partikelgröße bis zu 40 nm von den Wurzeln aufgenommen werden und bis in den Spross transportiert werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen unserer Messungen, dass Silber von den Wurzeln aufgenommen werden kann und bis in den Spross hinein in messbaren Größenordnungen wiederzufinden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass Silbernanopartikel über die Wurzel aufgenommen werden können. Hier wurde gezeigt, dass diese Aufnahme sogar aus Boden, in dem die Bioverfügbarkeit geringer sein sollte, möglich ist. Musante und White (2012) zeigen, dass es zur Hemmung von Biomasseentwicklung und Transpirationsrate von *Cucurbita pepo* L. bei Konzentrationen von 100 und 500 mg/L an Silbernanopartikeln kommt. Die Zugabe von Huminsäuren führt dabei zu einer Abschwächung der Toxizität der Silbernanopartikel, woraus letztlich geschlossen wird, dass eine Untersuchung von Nanopartikeln unter umweltrelevanten Bedingungen sehr wichtig ist. Hieraus ergibt sich, dass gerade die Untersuchung zur Wirkung von Silbernanopartikeln in Boden, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, wichtige Erkenntnisse zur Wirkung auf das Pflanzenwachstum liefert.

Es zeigt sich, dass die Ergebnisse aus den wenigen Studien die mit natürlichem Boden oder Testsubstrat durchgeführt wurden, mit den Ergebnissen für NM-300K vergleichbar sind. Versuche, die mit Hydrokulturen oder auf Filterpapier mit Suspensionen durchgeführt wurden, mögen erste hilfreiche Anhaltspunkte zur Wirkung von Nanopartikeln geben. Die Applikation und Durchführung der Versuche auf natürlichem Boden liefern jedoch wesentlich umweltrelevantere Ergebnisse.

#### Regenwurm Reproduktionstest

Bei Betrachtung der Biomasseentwicklung der adulten Tiere zeigte sich, dass es zu einer signifikanten Zunahme des Gewichts der Tiere, die Silbernanopartikeln oder Silbernitrat ausgesetzt waren, kam. Bei Versuchsbeginn zeigte sich ein Fluchtverhalten der adulten Würmer bei Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> von 120 und 200 mg/kg TM Boden. Die Würmer versuchten, trotz Beleuchtung, das Versuchsgefäß zu verlassen. Dieses Fluchtverhalten endete nach 24 Stunden. Im Anschluss war allerdings bis zum Zeitpunkt der Entnahme der adulten Tiere zu beobachten, dass die Würmer in der dünnen Futterschicht, die nicht kontaminiert war, zu finden waren. Dieses Verhalten wurde in vergleichbarer Weise in einer Studie von Shoults-Wilson et al. (2011a) dargestellt. Die adulten Würmer versuchten Boden, der mit Bodengehalten von 6,92 – 7,42 mg/kg TM Boden an

Silbernanopartikeln und Silbernitrat kontaminiert war, zu meiden. Die in dieser Studie verwendeten Silbernanopartikel waren im Vergleich zu NM-300K größer und mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) gecoatet. Es zeigten sich keine Unterschiede bei der Wirkung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub>. Daraus ist zu schließen, dass *Eisenia andrei* in der Lage ist Silberionen in Boden wahrzunehmen. Zusätzlich kann durch das beschriebene Verhalten der adulten Tiere, die Zunahme der Biomasse im Vergleich zur Kontrolle erklärt werden. Aufgrund dessen, dass die Würmer in den Gefäßen, in denen sie NM-300K und AgNO<sub>3</sub> ausgesetzt waren, mehrheitlich in der Futterschicht zu finden waren, kam es zu einer erhöhten Futteraufnahme und einer Zunahme der Biomasse.

Nach 56 Tagen wurden signifikante Unterschiede in der Anzahl der juvenilen Tiere ab einem Bodengehalt an NM-300K von 30 mg/kg TM Boden und an AgNO<sub>3</sub> von 15 mg/kg TM (dem niedrigsten getesteten Bodengehalt) festgestellt. Die Unterschiede zwischen der Toxizität von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> waren gering. Es wurden EC<sub>50</sub> Werte von 74 – 80 mg/kg TM Boden im Vergleich zur Kontrolle für NM-300K und 42 – 47 mg/kg TM Boden für AgNO<sub>3</sub> berechnet. In einem der Versuche mit NM-300K kam es zu einer signifikanten Hemmung der Reproduktion durch den Dispersanten NM-300K DIS. Es wurden mehrere Versuche, teilweise nicht dargestellt, zur Regenwurm Reproduktion mit NM-300K DIS durchgeführt und es kam in keinem dieser Versuche zu einer Hemmung der Reproduktion. Auch bei anderen Organismen wurde durch den Dispersanten keine Hemmung verursacht. Die Hemmung durch den Dispersanten NM-300K DIS ist nicht zu erklären. Der berechnete EC<sub>50</sub> Wert für NM-300K beim Vergleich mit der Kontrolle ohne Dispersant war in beiden durchgeführten Versuchen vergleichbar. Aus diesem Grund wurden zur Diskussion die Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle herangezogen.

Es gibt derzeit einige Studien, in denen die Wirkung von Silbernanopartikeln betrachtet wurde. Heckmann et al. (2011) untersuchten anhand eines Limit Tests bei einem Bodengehalt von 1000 mg/kg TM Boden die Mortalität und Reproduktion von *Eisenia fetida*. Es wurde ein mit PVP gecoatetes Silbernanopartikel mit einer Partikelgröße von 30 – 50 nm und, als Referenz, AgNO<sub>3</sub> untersucht. Für die Versuche wurde ein natürlicher Boden und kein OECD Substrat genutzt. Es zeigte sich, dass bei einem Bodengehalt von 1000 mg/kg TM Boden an Silbernanopartikeln 97,5% der adulten Würmer überlebten, während bei dem selben Bodengehalt an

AgNO<sub>3</sub> nur 2,5% der adulten Tiere überlebten. In dieser Studie wurde die Anzahl der Kokoons als Indikator für die Reproduktion genutzt. Es wurden allerdings bei 1000 mg/kg TM Boden für AgNO<sub>3</sub> keine Kokoons gefunden und selbst in den Replikaten mit Silbernanopartikeln, in denen 95% der adulten Würmer überlebt hatten, konnten keine Kokoons gefunden werden. Auch die in Kapitel 5.4 dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Reproduktion den sensitiveren Endpunkt darstellt und stark von Silbernanopartikeln und AgNO<sub>3</sub> beeinflusst wird.

In einer weiteren Studie von Shoults-Wilson et al. (2011b) wurde der Einfluss der Oberflächenbeschichtung von Silbernanopartikeln auf die Bioakkumulation und die Toxizität auf die Reproduktion von *Eisenia fetida* betrachtet. Die Versuche, die hier dargestellt wurden, wurden in künstlichem Testsubstrat durchgeführt. Es wurden mit PVP und mit Ölsäure gecoatete Silbernanopartikel mit einer Partikelgröße von 30 – 50 nm untersucht. Nominale Bodengehalte an Silbernanopartikeln von 10, 100 und 1000 mg/kg TM Boden wurden gegen Bodengehalte an Silbernitrat von 10 und 100 mg/kg TM Boden untersucht. In diesen Versuchen zeigte sich, dass weder die mit PVP noch die mit Ölsäure gecoateten Silbernanopartikel einen Einfluss auf das Wachstum und das Überleben der adulten Tiere hatten. Es wurden allerdings bei der Reproduktion von *Eisenia fetida* signifikante Unterschiede zur Kontrolle bei Bodengehalten von 773,3 mg/kg TM Boden für die mit PVP, 727,6 mg/kg TM Boden für die mit Ölsäure gecoateten Silbernanopartikel und bei 94,12 mg/kg TM Boden für Silbernitrat festgestellt. Die mit PVP und Ölsäure gecoateten Silbernanopartikel waren um einen Faktor 10 weniger toxisch als NM-300K. Neben dem Coating kann dies auch durch die unterschiedlichen Partikelgrößen von 30 – 50 nm im Vergleich zu 15 nm bei NM-300K erklärt werden. Die Resultate, die mit Silbernitrat erzielt wurden, sind mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Allerdings wurde auch in dieser Studie die Anzahl der Kokoons als Parameter für die Reproduktion gewählt, was den Vergleich erschwert. Nichtsdestotrotz zeigt sich anhand der Ergebnisse, dass die Partikeleigenschaften wie z.B. Partikelgröße und das Coating einen großen Einfluss auf die Stärke der Wirkung von Silbernanopartikeln im Regenwurm Reproduktionstest haben.

In einer dritten Studie von Shoults-Wilson et al. (2011c) wurde der Einfluss von Partikelgröße und Bodentyp auf die Toxizität von Silbernanopartikeln im Regenwurm Reproduktionstest untersucht. Dabei wurden zwei Bodenarten, ein sandiger Lehm,

vergleichbar mit RefeSol 01A, und künstliches Testsubstrat nach OECD Richtlinie 222 für die Versuche genutzt. Für die Versuche wurden zwei Silbernanopartikel mit unterschiedlichen Partikelgrößen von 10 nm und 30 – 50 nm genutzt, die beide mit PVP gecoatet waren. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Toxizität der beiden Silbernanopartikel festgestellt. Das Wachstum und die Reproduktion (ausgedrückt als „Juvenile und Würmer“) wurden in natürlichem Boden bei einem Bodengehalt von 7,413 mg/kg TM Boden durch Silbernitrat gehemmt. Die Silbernanopartikel zeigten keine signifikante Wirkung auf die untersuchten Endpunkte. Allerdings wurde nur ein nominaler Bodengehalt von 10 mg/kg TM Boden im natürlichen Boden untersucht. Die höhere Toxizität der Silbernanopartikel in den Versuchen der vorliegenden Arbeit können durch einen niedrigeren Anteil an organischer Substanz im Versuchsboden (0,93% bei RefeSol 01A, aber 1,77% in der dargestellten Studie) erklärt werden. Der Anteil an organischer Substanz beeinflusst die Mobilität von Silbernanopartikeln in Boden und es wurde gezeigt, dass Silber in mineralischen Böden mobiler ist als in Boden reich an organischer Substanz (Coutris et al. 2012).

Die angeführten Studien deuten an, dass die Toxizität von Silbernanopartikeln sehr stark von den Eigenschaften des Umgebungsmediums (z.B. Anteil der organischen Substanz) und von dem Coating der Silbernanopartikel abhängig ist. In allen in Kapitel 5.4 dargestellten Versuchen wurden kleinere Partikel im Vergleich zum Großteil der anderen Studien untersucht, welche ebenfalls einen Grund für die höhere Toxizität darstellen können.

#### Silbergehalt im Kompostwurm *Eisenia andrei*

Zusätzlich zu den typischen Endpunkten, die in einem Regenwurm Reproduktionstest betrachtet werden, wurde in den hier dargestellten Versuchen auch die Aufnahme und Akkumulation von Silber im Kompostwurm *Eisenia andrei* untersucht. Wie in OECD Richtlinie 222 (2004) beschrieben wurden, die adulten Würmer nach 28 Tagen aus dem Versuch entnommen. Diese Würmer wurden je Bodengehalt gepoolt und dann zunächst entkotet, gewaschen und zuletzt wurde der Silbergehalt der Würmer bestimmt. Für den Endpunkt der Reproduktion ergab sich eine Hemmung abhängig vom Bodengehalt und oberhalb von 15 mg/kg TM Boden, aber obwohl sich der niedrigste und höchste Bodengehalt mit einem Faktor 13 unterschieden, waren die Silbergehalte der Würmer vergleichbar. Würmer die NM-

300K ausgesetzt waren, wiesen einen höheren Silbergehalt auf als die, die vergleichbaren Gehalten an AgNO<sub>3</sub> ausgesetzt waren.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass schon bei einem Bodengehalt von 30 mg/kg TM Boden die maximale Aufnahmekapazität für Silber erreicht ist. In welchen Teilen des Wurms (Gewebe oder Darm) das Silber lokalisiert ist wurde nicht geklärt. Der vergleichbare Silbergehalt im Wurm bei Bodengehalten von 30 – 200 mg/kg TM Boden zeigen, dass die Aufnahme von Silbernanopartikeln und Silbernitrat nicht der Grund für die Hemmung der Reproduktion sind. Auf Basis dieser Erkenntnis zeigt sich, dass nicht die Fruchtbarkeit der adulten Würmer, sondern die Entwicklung der Kokoons und das Überleben der juvenilen Tiere die sensitivste Phase darstellen.

In der Studie von Shoults-Wilson et al. (2011b) wurde ein vom Bodengehalt abhängiger Anstieg an Silber im Gewebe der Würmer festgestellt. Nichtsdestotrotz lag keiner der berechneten Bioakkumulationsfaktoren über 1, womit keine Bioakkumulation der Silbernanopartikel vorlag. Die Bioakkumulationsfaktoren für die Silbernanopartikel und Silbernitrat bei Bodengehalten von 10 und 100 mg/kg TM Boden waren allerdings vergleichbar mit den Ergebnissen, die in dieser Arbeit bei 15 und 120 mg/kg TM Boden erzielt wurden.

Ähnlich wie bei den Regenwürmern werden auch Nematoden über das Bodenporenwasser Silber ausgesetzt. Entsprechend wurden auch Studien zur Diskussion herangezogen, in denen das Thema der Aufnahme von Silbernanopartikeln in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* behandelt wurde. In diesen Studien wurde gezeigt, dass Silbernanopartikel in Zellen der Darmgefäße zu finden waren, und dass ein Transgenerationen Transfer von Silbernanopartikeln möglich ist (Meyer et al. 2010). Citrat gecoatete Silbernanopartikel mit einer Partikelgröße von 50,6 nm führten in Abhängigkeit von der Konzentration zu epidermaler Zerklüftung und schweren epidermalen Schäden bei Konzentrationen von 10 und 100 mg/L (Kim et al. 2012). Diese beiden Studien wurden allerdings in flüssigem Medium und nicht in Boden durchgeführt, wodurch die Übertragbarkeit auf die Wirkung von Silbernanopartikeln im Darm und Gewebe von *Eisenia andrei* und auf die juvenilen Würmer und Kokoons vermindert wird.

### Silberionen im Bodenporenwasser

Die Konzentration an Silberionen im Bodenporenwasser wurde zusätzlich zum Gesamtgehalt an Silber im Boden mit Hilfe von DGTs gemessen. Hier zeigte sich, dass sowohl für NM-300K als auch  $\text{AgNO}_3$  nur ca. 0,0001% des nominalen Silbergehaltes im Boden als frei verfügbare Silberionen im Bodenporenwasser vorliegen.

In Versuchen mit *Caenorhabditis elegans* ergab sich bei der Messung der gelösten Silberionen in K-Medium nach 24 Stunden Inkubation Konzentrationen äquivalent zu 0,001% der nominalen Konzentrationen an Silbernanopartikeln (Kim et al. 2012). Die Unterschiede zu den in Kapitel 5.4 dargestellten Ergebnisse sind mit den unterschiedlichen Umgebungsmedien und unterschiedlichen Inkubationsverhältnissen zu erklären. In flüssigem K-Medium unterscheidet sich das Gleichgewicht zwischen Silbernanopartikeln und Silberionen von dem in Boden, was zu einer geringen Konzentration an Silberionen im Bodenporenwasser führt.

In weiteren Studien wurden die Reaktionen von Silberionen und weiteren umweltrelevanten Verbindungen untersucht. Die Freisetzung von Silberionen kann sich auch durch die Reaktion von Silbernanopartikeln mit Sulfidionen oder DOM verändern. Choi et al. (2009) zeigt in einer Studie mit Nitrifikanten einer Kläranlage, dass es zur Bildung von  $\text{Ag}_x\text{S}_y$  Komplexen und Ausfällungen kommen kann, wodurch die Toxizität von Silbernanopartikeln effektiv reduziert werden kann. Zusätzlich kommt es zu einer Bindung des DOM an Metallionen, wenn die Konzentration an DOM höher ist als die der Metallionen, was letztlich ebenfalls zu einer Verminderung der detektierbaren Silberionen führen kann (Aiken et al. 2011).

Ein vom Gesamtsilbergehalt im Boden abhängiger Anstieg der Silberionenkonzentration im Bodenporenwasser wurde an den beiden ersten Messzeitpunkten festgestellt. Zusätzlich wurden mit Hilfe der DGTs vergleichbare Werte an Silberionen bei vergleichbaren Bodengehalten für NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  gemessen. Die Wirkung von NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  auf die Reproduktion von *Eisenia andrei* war in allen Versuchen ebenfalls abhängig von dem Bodengehalt an NM-300K bzw.  $\text{AgNO}_3$  und für beide Substanzen vergleichbar. Daraus leitet sich ab, dass die frei verfügbaren Silberionen im Bodenporenwasser für die Hemmung der Regenwurm Reproduktion verantwortlich sind. Da der Effekt von NM-300K und

AgNO<sub>3</sub> in einem vergleichbaren Bereich liegt, kann darauf geschlossen werden, dass die lokal gesteigerte Ionenkonzentration an der Oberfläche von NM-300K in Relation gesehen zur gleichmäßigen Verteilung von Silbernitrat im Boden nicht relevant für die Toxizität im Regenwurm Reproduktionstest ist.

#### **9.4 Aktuelle Silbergehalte im Klärschlamm kommunaler Kläranlagen**

Auf Grundlage der Daten zur Wirkung auf die verschiedenen Trophieebenen im Boden wurde eine PNEC im Boden von 50 µg/kg TM Boden für NM-300K berechnet. Daraus folgt für den Klärschlammfad, dass Klärschlamm mit einem Gehalt an NM-300K von 30 mg/kg TS Klärschlamm auf Boden aufgebracht werden kann, bevor es zu einer Wirkung auf die Mikroorganismen kommt.

Die Messung von Nanosilber im Klärschlamm ist nicht in der AbfKlärV vorgesehen. Derzeit ist es, aufgrund fehlender Messmethoden, bei routinemäßigen Kontrollen lediglich möglich die Bestimmung des Gesamtgehaltes an Silber in Klärschlamm durchzuführen. Eine Differenzierung zwischen Silber, Silbernanopartikeln und Silberionen ist mit einer aufwendigen Messmethodik (Energiedispersive Röntgenspektroskopie; Single-Particle-ICP-MS; Flow-Field-Flow-Fractionation etc.) verknüpft und für die routinemäßige Kontrolle des Klärschlammes ungeeignet.

Im August 2002 wurden bei bundesweiten Erhebungen des Bundeslandes Hessen neun kommunale Kläranlagen jeweils einmal beprobt. Der Klärschlamm wurde auf seinen Silbergehalt untersucht und es zeigte sich, dass der Silbergehalt zwischen 4 mg/kg TS und 26,3 mg/kg TS Klärschlamm lag. Der Mittelwert der Messungen lag entsprechend bei 12,7 mg/kg TS. Im gleichen Zeitraum wurde auch der Silbergehalt in den kommunalen Kläranlagen aus Karlsruhe, Pforzheim und Nürnberg betrachtet. Hier lag der Silbergehalt im Klärschlamm 2007 bei 25 mg/kg TS in Karlsruhe, 45 mg/kg TS in Pforzheim und 12 mg/kg TS in Nürnberg (Hund-Rinke et al. 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch der Klärschlamm der kommunalen Kläranlage in Schmallenberg untersucht. Dieser Klärschlamm hatte einen Silbergehalt von ca. 1,8 mg/kg TS Klärschlamm. Eine Studie der US EPA zeigt, dass der Silbergehalt im Klärschlamm bei 1,94 – 856 mg/kg TS Klärschlamm liegt (United States Environmental Protection Agency 2009). In diesem Fall wurden allerdings die verschiedensten Standorte untersucht und nicht nur kommunale Kläranlagen ohne signifikanten industriellen Silbereintrag. Im Klärschlamm kommunaler Kläranlagen,

der für die landwirtschaftliche Nutzung in Frage kommt, liegt der Silbergehalt in einem Bereich von ca. 2 – 50 mg/kg TS Klärschlamm. Bei einem abgeleiteten PNEC von 30 mg/kg TS Klärschlamm kann somit für NM-300K ein Risiko für die Mikroorganismen des Bodens, bei Einarbeitung des Klärschlammes aus kommunalen Kläranlagen, nicht ausgeschlossen werden. Einschränkend muss gesagt werden, dass die Silbergehalte, die im Klärschlamm bestimmt wurden, den Gesamtsilbergehalt darstellen. Die PNEC wurde allerdings nur auf Basis des Silbernanopartikels NM-300K abgeleitet. Unter Berücksichtigung einer steigenden Nutzung und steigenden Freisetzung wird der Gehalt an Silbernanopartikeln im Klärschlamm steigen und somit die Diskrepanz geringer werden.

Neben diesen direkten Messungen des Silbergehaltes in Klärschlamm wurden auch verschiedene Modellierungen zur Exposition von Boden mit Silbernanopartikeln, unter anderem auch über den Klärschlammfad, erstellt. Bei diesen Modellierungen werden nur die PECs für Silbernanopartikel betrachtet. Entsprechend unterscheiden sich die Werte für die PEC stark von gemessenen Silbergehalten in Klärschlamm. Für Silbernanopartikel ergab sich eine PEC für Boden, auf den Klärschlamm aufgebracht wurde, von 1,5 µg/kg TM Boden im Jahr für Europa. In den USA zeigte sich, dass der Gehalt an Silbernanopartikeln zwischen 2008 und 2012 nach den Berechnungen von 2,3 auf 7,4 µg/kg TM Boden anstieg (Gottschalk et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde für NM-300K eine PNEC für Boden von 50 µg/kg TM Boden ermittelt. Der Gehalt an Silbernanopartikeln stieg jährlich um ca. 1 µg/kg TM Boden. Unter der Annahme eines vergleichbaren kontinuierlichen Anstieges würde die PNEC nach ca. 50 Jahren überschritten werden. In diesem Zusammenhang ist zusätzlich auch zu berücksichtigen, wie sich die Silbernanopartikel im Boden verhalten. Entsprechende Informationen können über Säulen- und Lysimeterversuche erhalten werden. Entsprechende Untersuchungen laufen derzeit an der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (Promotion Martin Hoppe). Danach ist mit einer geringen Mobilität der Silbernanopartikel im Boden zu rechnen. Bei einer wiederholten Applikation von Klärschlamm auf Boden ist von einer Anreicherung der Silbernanopartikel auszugehen. Deren langfristige Verfügbarkeit wird in einer Studie von Coutris et al. (2012) gezeigt. 80% der in Boden eingebrachten Silbernanopartikel (Partikelgröße 19 nm) bei Versuchen über 70 Tage

waren nicht extrahierbar, jedoch wirkten sie als ständige Quelle von bioverfügbarem Silber.

Die Risikocharakterisierung wurde für NM-300K durchgeführt. Letztlich muss hierbei festgestellt werden, dass es eine Vielzahl an verschiedenen Silbernanopartikeln mit verschiedenen Eigenschaften auf dem Markt gibt. Einige dieser Silbernanopartikel werden eine stärkere, andere eine schwächere und wieder andere keine toxische Wirkung auf Organismen des terrestrischen Ökosystems haben. Nichtsdestotrotz zeigen die Untersuchungen für NM-300K für Boden und den Klärschlammfad erstmalig, dass Silbernanopartikel auch nach Transformationen, Sorption an Klärschlamm und Alterung im Boden zu einer Toxizität auf Organismen des terrestrischen Ökosystems unter umweltrelevanten Bedingungen führen können.

## 10 Schlussfolgerung

- I. Im Atmungshemmtest nach OECD Richtlinie 209 (1984) hat sich gezeigt, dass die Wirkung von NM-300K in der Kläranlage stark von der Zusammensetzung des Umgebungsmediums bzw. des Abwassers abhängig ist. Vor allem die Konzentration der verschiedenen Salze scheint dabei eine große Rolle zu spielen. Schwache pH-Wert-Veränderungen und der Zusatz von Komplexbildnern und Waschwasser hatten keinen Einfluss auf die Wirkung von NM-300K.
- II. Bei einer Reduktion von potentiellen Liganden aus dem Klärschlamm ist von einer erhöhten Sensitivität der Mikroorganismen des Klärschlammes auf Schadstoffe auszugehen. Auf Basis dieser Schlussfolgerung würde die ältere Version der OECD Richtlinie 209 von 1984 bei der potentielle Liganden im Gegensatz zur Version von 2010 nicht durch Waschen entfernt werden, eine höhere Umweltrelevanz der Ergebnisse bewirken.
- III. Anhand der Ergebnisse hat sich gezeigt, dass der Atmungshemmtest nach OECD Richtlinie 209 (1984) sehr gut für die Untersuchung der Wirkung von Nanopartikeln auf die Mikroorganismen im Klärschlamm geeignet ist. Die Ergebnisse zur Wirkung sind auf die Kläranlagen übertragbar. Bei tiefergehenden Fragestellungen bezüglich der Wirkung auf verschiedene Mikroorganismengruppen und dem Verbleib der Nanopartikel in der Kläranlage ist allerdings eine Kläranlagensimulation durchzuführen.
- IV. Die Kläranlagensimulationen haben bestätigt, dass bei umweltrelevanten Konzentrationen > 90% der Silbernanopartikel im Klärschlamm verbleiben und nicht in den Vorfluter gelangen. Es konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass auch NM-300K mit Schwefelquellen reagiert und Ag<sub>2</sub>S bildet.
- V. An Klärschlamm gebundene Silbernanopartikel (NM-300K) entfalten nach Abbau des Klärschlammes wieder die Wirkung von reinem NM-300K. Diese Aussage gilt nur für entwässerten, nicht gefaulten Klärschlamm.
- VI. Die Tatsache, dass die Wirkung nach dem Abbau des Klärschlammes vergleichbar mit jener mit reinem NM-300K ist, zeigt, dass die Betrachtung von Transformationen und die Durchführung von Langzeitversuchen für eine umweltrelevante Risikoabschätzung für Silbernanopartikel unabdingbar ist.

- VII. Die Risikocharakterisierung zeigt, dass die PNEC für NM-300K im Boden bei 0,05 mg/kg TM Boden und für den Klärschlammfad bei 30 mg/kg TS Klärschlamm liegt. Nur wenige Informationen zum Verbleib von Silbernanopartikeln im Boden sind derzeit vorhanden. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die Mobilität in Böden eingeschränkt ist. Bei einer Applikation von Klärschlamm aus kommunalen Kläranlagen mit Silbergehalten von 2-50 mg/kg TS Klärschlamm und einer Akkumulation an Silber in Böden, wären Gehalte, die der PNEC entsprechen, somit schnell erreicht.
- VIII. Der Vergleich von PEC-Werten aus Modellrechnungen für Boden, auf den mit Silbernanopartikeln belasteter Klärschlamm ausgebracht wurde, mit den in dieser Arbeit abgeleiteten PNECs für NM-300K zeigt, dass bei wiederholter Applikation von Klärschlamm ein Risiko für Organismen des terrestrischen Ökosystems nicht ausgeschlossen werden kann.
- IX. In der Novellierung der AbfKlärV wird ein Grenzwert für Nanopartikel nicht vorgesehen. Dies liegt vor allem daran, dass keine Messverfahren für die routinemäßige Kontrolle verfügbar sind. Die Produktion, Anwendung und Freisetzung von Silbernanopartikeln steigt, wodurch auch der Anteil an Silbernanopartikeln im Klärschlamm deutlich erhöht wird. Dieser Sachverhalt legt nahe, dass den Prüfparametern für Klärschlamm, die in der AbfKlärV angegeben sind, auch der Silbergehalt hinzugefügt werden sollte, so dass ein möglicher Anstieg des Silbergehaltes frühzeitig erkannt wird.
- X. Es bestehen Hinweise darauf, dass durch die Faulung von Klärschlamm eine langfristige Detoxifizierung von Silbernanopartikeln bewirkt wird. Weitere Untersuchungen sind zur Untermauerung notwendig.

## 11 Zusammenfassung / Summary

### 11.1 Deutsche Version

Silbernanopartikel bieten eine Vielzahl an Einsatzmöglichkeiten in den verschiedensten Produkten. Dies liegt vor allem an der antibakteriellen Wirkung, hervorgerufen durch die Freisetzung von Silberionen und der daraus resultierenden Hemmung des Wachstums von Mikroorganismen. Bei Silbernanopartikeln kann die antibakterielle Wirkung nicht nur durch die Ionenfreisetzung, wie bei metallischem Silber erzielt werden, sondern auch durch die geringe Partikelgröße. Gegenwärtig werden Silbernanopartikel wegen ihrer antibakteriellen Eigenschaften in zahlreichen Produkten verschiedenster Art wie z.B. Textilien, Pflegeprodukten, Kosmetika, Wandfarben, aber auch in der Medizin eingesetzt (Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2011). Die zunehmende und immer vielfältiger werdende Nutzung von Silbernanopartikeln erhöht gleichzeitig das Risiko der Freisetzung dieser Partikel in die Umwelt.

Einhergehend mit einer Freisetzung sind die Silbernanopartikel verschiedenen Einflüssen des Umgebungsmediums ausgesetzt, die voraussichtlich zu einer Veränderung ihrer Eigenschaften führen. Es kann zu einer Änderung der Wirkung auf die verschiedenen Organismen kommen. Weiterhin ist es nicht möglich eine Risikocharakterisierung durchzuführen, ohne neben der reinen nanopartikulären Form auch Modifizierungen und Transformationsprozesse zu betrachten (Nowack et al. 2012). Hierbei stellt speziell auch die Wirkung von Nanopartikeln in Langzeitversuchen und die Aufnahme der Nanopartikel durch Organismen ein schwieriges Thema dar (Som et al. 2011). Dies betrifft unter anderem die Wirkung von nanopartikelhaltigem Klärschlamm, der als landwirtschaftlicher Dünger auf Ackerflächen aufgebracht wird. In Deutschland fallen jährlich etwa zwei Millionen Tonnen Trockensubstanz Klärschlamm aus kommunalen Kläranlagen an, von denen ein Teil nach wie vor als landwirtschaftlicher Dünger genutzt wird. In weiten Teilen Südeuropas (Spanien, Portugal, Frankreich) und in Großbritannien wird sogar der größte Teil des Klärschlammes auf landwirtschaftliche Flächen ausgebracht (Wiechmann et al. 2012).

Das **Ziel der Promotionsarbeit** war die Anfertigung einer Risikocharakterisierung für das Silbernanopartikel NM-300K, aus dem OECD Sponsorship Programme, in

Böden. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Eintrag von Silbernanopartikeln, die in der Kläranlage an Klärschlamm adsorbiert werden, der wiederum als landwirtschaftlicher Dünger auf Ackerboden aufgebracht wurde. Der Gehalt an Silbernanopartikeln im Klärschlamm sollte bestimmt werden, bis zu dem keine Effekte auf die Organismen des terrestrischen Ökosystems zu erwarten sind.

Die dargestellte Risikocharakterisierung für NM-300K für Böden und den Klärschlamm pfad gibt erstmalig Einblicke in mögliche Risiken für das terrestrische Ökosystem unter umweltrelevanten Bedingungen, vergleichbare komplexe und aufwendige Studien fehlen derzeit völlig.

Zur **Erstellung der Risikocharakterisierung** wurden die Arbeiten in **drei Phasen** unterteilt: (1) die Erstellung eines Grunddatensatzes zur Wirkung von NM-300K in Boden und Klärschlamm, (2) die Auswirkung von verschiedenen Abwasserkomponenten auf die Wirkung von NM-300K im Klärschlamm und (3) die Erstellung eines realistischen Nutzungsszenarios zur Aufbringung von silbernanopartikelhaltigem Klärschlamm als landwirtschaftlicher Dünger auf Boden (Klärschlamm pfad). Am Ende der durchgeführten Untersuchungen sollte eine Empfehlung über die Notwendigkeit der Messung des Silbergehaltes in Klärschlamm vor der landwirtschaftlichen Nutzung für die Novellierung der Klärschlammverordnung ausgesprochen werden. Darüber hinaus sollte beurteilt werden, ob und inwiefern die standardisierten Richtlinien der OECD, ISO und DIN für die Stoffgruppe der Nanomaterialien angepasst werden müssen.

Die Untersuchungen wurden entsprechend mit den standardisierten Testverfahren der OECD, ISO und DIN durchgeführt. Die Wirkung von reinem NM-300K auf Organismen verschiedener Trophieebenen (Mikroorganismen, Pflanzen, Würmer) des terrestrischen Ökosystems wurde ebenso betrachtet, wie die Wirkung von NM-300K auf die Mikroorganismen des Klärschlammes. Zusätzlich wurden in Langzeitversuchen über 140 Tage der Eintrag von Silbernanopartikeln über Klärschlamm in den Boden simuliert. Die Applikation der Silbernanopartikel erfolgte in den Langzeitversuchen durch eine Kläranlagensimulation über 10 Tage. Anschließend wurde der Klärschlamm entwässert und, gemäß der deutschen Klärschlammverordnung, auf Boden aufgebracht. Durch die Applikation der Silbernanopartikel über eine Kläranlagensimulation waren diese zunächst möglichen Transformationsreaktionen in der Kläranlage ausgesetzt. Dieses Testdesign

ermöglichte eine größtmögliche Umweltrelevanz. Neben dem Silbernanopartikel NM-300K wurden alle Versuche auch mit  $\text{AgNO}_3$  als reine Silberionenquelle durchgeführt. Auf diese Weise konnte bei auftretenden Effekten, zwischen Effekten hervorgerufen durch Partikel und Ionen differenziert werden.

Die Wirkung von reinem NM-300K und  $\text{AgNO}_3$  auf Klärschlamm wurde sowohl in Kläranlagensimulationen als auch mit Hilfe des Screening Test (Atmungshemmtest) untersucht. In den Kläranlagensimulationen wurde neben der Wirkung auf die Mikroorganismen des Klärschlammes auch die Frage des Verbleibs von NM-300K bzw.  $\text{AgNO}_3$  in der Kläranlage betrachtet.

Mit dem **Atmungshemmtest** wurde der Einfluss einer großen Anzahl an verschiedenen Modifikationen des Umgebungsmediums (Veränderung des pH-Wertes, des Salzgehaltes; Zusatz verschiedener Komplexbildner; Zugabe von Waschwasser aus einer Waschflotte der Hohenstein Institute) auf die Wirkung der Silbernanopartikel ebenso untersucht, wie die Wirkung von silbernanopartikelhaltigen Fasern. Hier zeigte sich, dass die Wirkung von NM-300K sehr stark von der Zusammensetzung des Abwassers abhängig ist. Der größte Einfluss auf die Wirkung von NM-300K in der Testreihe zeigte sich bei der Veränderung der Zusammensetzung des synthetischen Abwassers. Das in den Versuchen genutzte synthetische Abwasser setzte sich sowohl aus organischen Komponenten wie Pepton, Harnstoff und Fleischextrakt als auch aus einer Vielzahl an Salzen zusammen. Bei einer Halbierung der Anteile dieser Inhaltsstoffe ergab sich eine Erhöhung der Toxizität von NM-300K, während bei einer Aufkonzentrierung der Inhaltsstoffe keine Wirkung auf die Mikroorganismen des Klärschlammes mehr festzustellen war. Weder eine Veränderung des pH-Wertes noch der Zusatz von Waschwasser oder verschiedenen Komplexbildnern beeinflusste die Toxizität von NM-300K auf diese Weise. In den Versuchen mit silbernanopartikelhaltigen Fasern zeigte sich eindeutig, dass eine Wirkung nur bei einem direkten Kontakt zwischen Fasern, in die die Silbernanopartikel eingearbeitet wurden, und Mikroorganismen verursacht wurde.

In den **Kläranlagensimulationen** zeigte sich, dass bei umweltrelevanten Konzentrationen > 90% der Silbernanopartikel von dem Klärschlamm adsorbiert wurden. Nur bei sehr hohen, nicht umweltrelevanten Einlaufkonzentrationen an NM-300K zeigte sich eine schwache Wirkung auf die DOC-Elimination der

Mikroorganismen. Die beobachtete Wirkung nahm im Laufe des Versuchs allerdings kontinuierlich ab. Des Weiteren wurde bei einer kontinuierlichen Zugabe von hohen Konzentrationen an NM-300K gegen Ende des Versuchs eine Hemmung des Ammoniumumsatzes festgestellt.

Die Ergebnisse mit NM-300K und auch AgNO<sub>3</sub> haben gezeigt, dass der Atmungshemmtest nach OECD Richtlinie 209 (1984) für eine Voruntersuchung zur Wirkung von Nanopartikeln auf die Mikroorganismen im Klärschlamm sehr gut geeignet ist. Die Ergebnisse aus den Atmungshemmtests waren auch auf die Kläranlagen übertragbar. Bei tiefergehenden Fragestellungen bezüglich der Wirkung auf verschiedene Mikroorganismengruppen und vor allem bei Fragen zum Verbleib der Silbernanopartikel ist allerdings die Durchführung einer Kläranlagensimulation unumgänglich.

In den Versuchen zur **Wirkung von NM-300K auf Organismen der verschiedenen Trophieebenen des terrestrischen Ökosystems** (Testdauer 28 Tage) zeigte sich, dass die Primärdestruenten, hier die Nitrifikanten, am stärksten durch die Silbernanopartikel beeinflusst wurden. Hier ergab sich eine NOEC von 0,5 mg/kg TM Boden. Aber auch das Pflanzenwachstum von *Phaseolus aureus* L. (Bohne) und *Avena sativa* L. (Hafer) wurde schon bei niedrigen Bodengehalten an NM-300K (NOEC: 1,5 mg/kg TM Boden) gehemmt. Die geringste Wirkung wurde bei der Regenwurm Reproduktion in Gegenwart von NM-300K erzielt.

In den **Langzeitversuchen** mit über Klärschlamm zugegebenen NM-300K zeigte sich, dass die Wirkung von NM-300K auf die Mikroorganismen in Böden ab einer Versuchsdauer von 100 Tagen vergleichbar war mit der von reinem NM-300K in Versuchen über 28 Tagen. In einem Pflanzenwachstumstest mit *Phaseolus aureus* L. nach 180 Tagen zeigte sich, dass das Wachstum bei hohen Bodengehalten an NM-300K und AgNO<sub>3</sub> vermindert war, und dass in Spross und Blättern der Pflanzen geringe Mengen an Silber gemessen werden konnten. Die Untersuchungen der mikrobiellen Bodendiversität ergaben, dass NM-300K vor allem den Stickstoffkreislauf beeinflusste, dass es aber auch zu einer Wirkung auf den Kohlenstoff- und Phosphorkreislauf kommen kann.

Anhand der Langzeitversuche lässt sich schließen, dass mit fortschreitendem Abbau des Klärschlammes ein Teil der Silbernanopartikel wieder bioverfügbar wird. Ob die

Wirkung in den Langzeitversuchen durch die Silbernanopartikel oder durch freigesetzte Silberionen hervorgerufen wird, konnte aufgrund fehlender Messmethoden im Rahmen der Dissertation nicht geklärt werden. Allgemein zeigte sich in den verschiedenen Versuchen, dass die standardisierten Richtlinien der OECD, ISO und DIN zur Untersuchungen von Nanopartikeln geeignet sind.

Aufgrund der Vergleichbarkeit der Wirkung in den Versuchen mit reinem NM-300K und in den Langzeitversuchen wurde die **Risikocharakterisierung für NM-300K**, in Böden und eingebracht über Klärschlamm in Böden, auf Basis der Ergebnisse mit reinem NM-300K angefertigt. Die Berechnung erfolgte auf Basis des Bodengehalts, bei dem einer der untersuchten Organismen (Mikroorganismen, Pflanze, Wurm) am sensitivsten reagiert hatte. In diesem Fall waren dies die Nitrifikanten, bei denen sich eine  $EC_{10}$  nach 28 Tagen von 0,5 mg/kg TM Boden für NM-300K ergeben hatte. Der Charakterisierung lagen NOEC und  $EC_{10}$  Werte von mindestens drei Versuchen mit drei verschiedenen Organismen zu Grunde, wodurch ein Bewertungsfaktor von 10 zu wählen war. Auf dieser Grundlage wurde eine PNEC im Boden von 0,05 mg/kg TM Boden für NM-300K berechnet. Die berechnete PNEC wurde auf den Klärschlammfad übertragen. Nach AbfklärV dürfen 5 Tonnen TS Klärschlamm pro Hektar in 3 Jahren auf eine Ackerfläche aufgetragen werden. Bei einer angenommenen Bodentiefe von 20 cm und einer Bodendichte von 1,5 g/cm<sup>3</sup> ergab sich, dass 1,67 g TS / kg TM Boden aufgebracht werden dürfen. Auf Basis dieser Berechnungen darf über den Klärschlammfad (1,67 g TS Klärschlamm), bei einer PNEC im Boden von 0,05 mg an NM-300K, auf einen Kilogramm Boden einmalig Klärschlamm mit einem Gehalt von 30 mg/kg TS Klärschlamm für NM-300K aufgebracht werden. Über einen Zeitraum von 200 Jahren würde es zu ca. 60 Ausbringungen an Klärschlamm auf die landwirtschaftlich genutzte Fläche kommen. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die Mobilität in Boden eingeschränkt ist. Unter der Annahme, dass die Bioverfügbarkeit von Silber nicht zurückgeht, würde dies bedeuten, dass Klärschlamm nur dann auf die Fläche aufgebracht werden darf, wenn der Gehalt an Silber bei ca. 0,5 mg/kg TS Klärschlamm liegt. Aus in Deutschland erhobenen Monitoringdaten zu Silbergehalten in Klärschlamm wird deutlich, dass derzeit von einem Gehalt von ca. 2 – 50 mg/kg TS Klärschlamm auszugehen ist. Der Angabe eines aufgerundeten Silbergehaltes von 2 mg/kg TS Klärschlamm liegen die Messwerte zu Grunde, die im Rahmen der Dissertation in

Klärschlamm ermittelt wurden, der Gehalt von 50 mg/kg TS Klärschlamm stammt aus einer Literaturstudie (Hund-Rinke et al. 2007). Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei diesen Werten nicht zwischen den einzelnen Silberformen unterschieden wird, und dass es sich um den Gesamtsilberanteil im Klärschlamm handelt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann ein Risiko durch den Eintrag von Silbernanopartikeln nicht ausgeschlossen werden.

In der Novellierung der AbfKlärV wird ein Grenzwert für Nanopartikel nicht vorgesehen. Dies liegt vermutlich daran, dass keine Standardmessverfahren zur Differenzierung zwischen den einzelnen Silberformen verfügbar sind. Die Vergleichbarkeit der PNEC für NM-300K mit vorhandenen Silbergehalten in Klärschlamm deutet auf ein mögliches Risiko für Organismen des terrestrischen Ökosystems hin. Zusätzlich steigt die Produktion, Anwendung und Freisetzung von Silbernanopartikeln, wodurch das Risiko deutlich erhöht wird. Diese Sachverhalte legen nahe, dass den Prüfparametern für Klärschlamm, die in der AbfKlärV angegeben sind, auch der Silbergehalt hinzugefügt werden sollte, so dass ein möglicher Anstieg des Silbergehaltes frühzeitig erkannt wird.

## 11.2 English version

Silver nanoparticles are used because of their antibacterial properties in numerous and varying products such as textiles, toiletries, cosmetics, wall colours and medication (Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2011). The antibacterial effect is caused by the release of silver ions as in metallic silver and the small particle size. The increasing and diverse use of silver nanoparticles simultaneously increases the risk of particle release into the environment.

Silver nanoparticles are influenced by the ambient medium into which they are released, likely resulting in a change in properties. There may be also a change in the effect on the targeted organisms. Because of these possibilities, any risk characterisation of silver nanoparticles must include (aside from the pure nanoparticulate form) the modification and transformation processes (Nowack et al. 2012). The effects of nanoparticles in long-term tests and the uptake of the nanoparticles by organisms are therefore difficult to examine, but are a necessary practicality (Som et al. 2011). One topic, among others, is the effect of sludge (containing nanoparticles) that is applied as an agricultural fertiliser on farmland. In Germany two million tons of dry sewage sludge solids from municipal wastewater treatment plants are produced annually. A portion of this sludge is still used as an agricultural fertiliser. In Spain, Portugal, France and the UK the majority of the sewage sludge produced is applied to agricultural land (Wiechmann et al. 2012).

The aim of the dissertation was to prepare a risk characterisation of the silver nanoparticle NM-300K (from the OECD Sponsorship Programme) in soils. The main focus was the entry of silver nanoparticles (NM-300K), which are absorbed into the sludge during the wastewater treatment phase and then applied as an agricultural fertiliser on farmland. The content of silver nanoparticles in sewage sludge in which no effects were expected on the organisms of the terrestrial ecosystem was determined.

It was hoped that the prepared risk characterisation for NM-300K for the soils and sludge pathway would allow insight into the possible risks to the terrestrial ecosystem under natural conditions as similar complex and elaborate studies are presently lacking.

In preparing the risk characterisation, the work was divided into three parts: (1) the creation of a basic database of the effects of pure NM-300K in soil and sludge, (2) the affect of various wastewater components on the effects of NM-300K in sewage sludge, and (3) the creation of a realistic use scenario for applying sludge containing silver nanoparticles as an agricultural fertiliser to soil (sludge pathway). At the end of the investigations recommendations for the need to measure silver content in sewage sludge for agricultural use, and the revision of the sewage sludge ordinance should be given. Moreover, it was assessed whether, and how, the standardised guidelines of the OECD, ISO, and DIN for the substance group of nanomaterials should be developed.

The studies were conducted in accordance with the standardised test methods of the OECD, ISO, and DIN. The effects of pure NM-300K on different trophic organisms (microorganisms, plants, worms) of the terrestrial ecosystem was considered as well as the effects in sewage sludge in a respiration inhibition screening test and with simulations of a wastewater treatment plant. Additionally, long-term experiments over 140 days simulated the entry of silver nanoparticles via sewage sludge sludge in soil. The sewage sludge was prepared using a simulated wastewater treatment plant with silver nanoparticle application over 10 days. The sludge was then dewatered and, according to the German sewage sludge ordinance, applied to soil. The wastewater treatment plant simulation allowed exposure of the particles to possible transformation reactions, providing maximum environmental relevance. All experiments were also performed with  $\text{AgNO}_3$  as a pure silver ion source. Through this it was possible to differentiate effects caused by particles or ions. The fate of NM-300K and  $\text{AgNO}_3$  in the wastewater treatment plant was also considered.

In the respiration inhibition test the influence of modifications to the ambient medium (addition of various complexing agents, change in pH, salinity; addition of washing water from a washing liquor of the Hohenstein Institute) on the effect of the silver nanoparticles was examined as well as the effect of silver nanoparticle-containing fibers. The effect of NM-300K is highly dependent on the composition of the wastewater. The biggest influence on the effect of NM-300K in the test series was evident in the change in the composition of the synthetic wastewater. The synthetic wastewater was made up of organic compounds such as peptone, meat extract and urea and a variety of salts. By halving the proportions of these ingredients, there was

an increase in the toxicity of NM-300K, while at a tenfold concentration of the ingredients no effect on the microorganisms of the sludge was observed. Neither a change in the pH nor the addition of washing liquor or different complexing agents influenced the toxicity of NM-300K in this way. The experiments with silver nanoparticle-containing fibers clearly showed that an effect occurred by direct contact between fibers in which the silver nanoparticles have been incorporated, and microorganisms.

The wastewater treatment plant simulations showed that at environmentally relevant concentrations > 90% of the silver nanoparticles were adsorbed by the sludge. Only at very high, but environmentally irrelevant concentrations of NM-300K did a weak effect on the DOC elimination of microorganisms occur. However, the observed effect declined during the course of the experiment. Furthermore, an inhibition of the ammonium turnover was determined after continuous addition of high concentrations of NM-300K towards the end of the experiment.

The results from NM-300K and AgNO<sub>3</sub> testing have shown that the respiration inhibition test, performed according to OECD Guideline 209 (1984), is suitable for a preliminary study of the effects of nanoparticles on microorganisms in sludge. The results from the respiration inhibition test were also applicable to the treatment plants. In-depth questions regarding the effect on different microbial groups and the fate of silver nanoparticles required the implementation of a wastewater treatment plant simulation.

The experiments of the effect of NM-300K on organisms of different trophic levels of the terrestrial ecosystem (test duration 28 days) showed that the primary destruents, in this case the nitrifiers, were most influenced by the silver nanoparticles. The NOEC was 0.5 mg/kg dry soil. Growth (biomass) of the plants *Phaseolus aureus* L. (bean) and *Avena sativa* L. (oat) was inhibited at low contents of NM-300K (NOEC 1.5 mg/kg dry soil). The slightest effect in the presence of NM-300K was achieved in the earthworm reproduction test.

The long-term experiments on sewage sludge with added NM-300K showed that the effect of NM-300K on the microorganisms in the soil from an experimental period of 100 days was similar to that of pure NM-300K in tests over 28 days. A plant growth test with *P. aureus* L showed that after 180 days growth (biomass) was reduced at

high contents of NM-300K and  $\text{AgNO}_3$ , and small amounts of silver could be measured in shoots and leaves of the plants. The investigations of the soil microbial diversity showed that NM-300K particularly influenced the nitrogen cycle and partially the carbon and phosphorus cycles.

With reference to the long-term tests it can be concluded that with the degradation of sludge, a portion of silver nanoparticles again becomes bioavailable. Whether the effect is caused in the long-term experiments by silver nanoparticles or released silver ions can not be resolved in this thesis, due to the absence of measurement methods. The tests performed using standardised guidelines of the OECD, ISO, and DIN are suitable for studies of nanoparticles.

Because of the comparability of the effect between the experiments in soil (with pure NM-300K) and sewage sludge in soil (long term experiments), the risk characterisation was based on the results of pure NM-300K. The calculations were based on the nanoparticle content in soil affecting the most sensitive organism studied. Here the nitrifiers were most sensitive with an  $\text{EC}_{10}$  of NM-300K after 28 days of 0.5 mg/kg dry soil. Since three experiments with three different organisms were performed an assessment factor of 10 was chosen. A PNEC in soil of 0.05 mg/kg dry soil was calculated for NM-300K. The calculated PNEC was theoretically applied to the sludge pathway. According to the German sewage sludge ordinance 5 tons of dry sludge per hectare can be applied over 3 years on farmland. At an assumed soil depth of 20 cm and density of  $1.5 \text{ g/cm}^3$  1.67 g TS / kg dry soil was calculated as the applicable rate. Based on these calculations, and a PNEC in soil of 0.05 mg NM-300K, one kilogram of soil with a content of 30 mg/kg dry sludge can be applied via the sludge pathway (1.67 g dry sludge). Over a period of 200 years, about 60 times that amount of sludge would be spread on the agricultural land. However, there are indications that nanoparticle mobility is limited in the ground. Assuming that the bioavailability of silver does not return sludge may be applied to the surface if the content of silver is at approximately 0.5 mg/kg dry sludge. The monitoring data of silver content in sewage sludge collected in Germany indicates that currently the silver content ranges from 2 - 50 mg/kg dry sludge. The assumption of a rounded silver content of 2 mg/kg dry sludge is based on measurements that were conducted as part of this dissertation, while the concentration of 50 mg/kg dry sludge was derived from a literature review (Hund-Rinke et al. 2007). There is no

distinction in these values between the individual silver forms. Based on the present results, risk to terrestrial organisms from the introduction of silver nanoparticles via the sludge pathway cannot be excluded.

The amendment of the German sewage sludge ordinance does not stipulate a maximum nanoparticle concentration. This is probably because no standard measurement method for differentiation between the various forms of silver is available. The comparability of the PNEC for NM-300K with existing silver contents in sewage sludge indicates a potential risk to organisms of the terrestrial ecosystem. With increasing production, use, and release of silver nanoparticles, the risk also significantly increases. These facts suggest that the measurement of silver content should be added to the test parameters for sewage sludge specified in the sewage sludge ordinance, so that a possible increase of the silver content is detected early.

## 12 Literaturverzeichnis

- AbfKlärV §4 (1992). Deutsche Klärschlammverordnung. 15. April 1992 (BGBl. I S. 912).
- AbfKlärV §6 Absatz 1 (1992): Deutsche Klärschlammverordnung. 15. April 1992 (BGBl. I S. 912).
- Ahamed, M., Alsahhi, M.S. und Siddiqui, M.K. (2010): Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta* 411 (23-24): 1841-1848.
- Aiken, G.R., Hsu-Kim, H. und Ryan, J.N. (2011): Influence of dissolved organic matter on the environmental fate of metals, nanoparticles, and colloids. *Environ Sci Technol* 45 (8): 3196-3201.
- Allen, H.J., Impellitteri, C.A., Macke, D.A., Heckmann, J.L., Poynton, H.C., Lazorchack, J.M., Govindaswamy, S., Roose, D.L. und Nadagouda, M.N. (2010): Effects from Filtration, Capping Agents, and Presence/Absence of Food on the Toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 29 (12): 2742 - 2750.
- Badawy, A.M.E., Luxton, T.P., Silva, R.G., Scheckel, K.G., Suidan, M.T. und Tolaymat, T.M. (2010): Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspension. *Environ Sci Technol* 44: 1260 - 1266.
- Benn, T.M. und Westerhoff, P. (2008): Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially available Sock Fabrics. *Environ Sci Technol* 42: 4133-4139.
- Bergs, C.G. (2010): Neuerungen im Abfall-Düngerecht - Auswirkungen auf die Verwertung und Beseitigung von Klärschlamm. *VDI-Fachkonferenz Offenbach*.
- Bilberg, K., Malte, H., Wang, T. und Baatrup, E. (2010): Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquat Toxicol* 96 (2): 159-165.
- Blaser, S.A., Scheringer, M., Macleod, M. und Hungerbühler, K. (2008): Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Sci Total Environ* 390 (2-3): 396-409.
- Bundesministerium für Bildung und Forschung (2010 - 2013). Förderprojekt "UMSICHT" - Abschätzung der Umweltgefährdung durch Silber-Nanomaterialien: vom Chemischen Partikel bis zum Technischen Produkt. Förderkennzeichen 03X0091.
- Burkhardt, M., Englert, A., Iten, R. und Schärer, S. (2011): Entsorgung nanosilberhaltiger Abfälle in der Textilindustrie - Massenflüsse und Behandlungsverfahren. Forschungsbericht, HSR Hochschule für Technik, Rapperswill, Schweiz.

- Burkhardt, M., Zuleeg, S., Kägi, R., Sinnet, B., Eugster, J., Boller, M. und Siegrist, H. (2010): Verhalten von Nanosilber in Kläranlagen und dessen Einfluss auf die Nitrifikationsleistung in Belebtschlamm. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 22 (5): 529-540.
- Chaloupka, K., Malam, Y. und Seifalian, A.M. (2010): Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 28 (11): 580-588.
- Choi, O., Clevenger, T.E., Deng, B., Surampalli, R.Y., Ross, L., Jr. und Hu, Z. (2009): Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Res* 43 (7): 1879-1886.
- Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.J., Ross, L., Jr., Surampalli, R.Y. und Hu, Z. (2008): The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res* 42 (12): 3066-3074.
- Coutris, C., Joner, E.J. und Oughton, D.H. (2012): Aging and soil organic matter content affect the fate of silver nanoparticles in soil. *Sci Total Environ* 420: 327-333.
- Davison, B. und Zhang, H. (2011). "Technical Information: DGT – for measurements in waters, soils and sediments." from <http://www.dgtresearch.com/>.
- DIN EN ISO 15797 (2004). Textilien - Industrielle Wasch- und Finishverfahren zur Prüfung von Arbeitskleidung, Deutsche Fassung. Deutsches Institut für Normung. Berlin, Deutschland.
- DIN ISO 10390 (2005). Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des pH-Wertes. Deutsches Institut für Normung. Berlin, Deutschland.
- DIN Richtlinie 38414-7 (1983). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Schlamm und Sedimente (Gruppe S) - Aufschluss mit Königswasser zur nachfolgenden Bestimmung des säurelöslichen Anteils von Metallen (S 7). Deutsches Institut für Normung. Berlin, Deutschland.
- ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment (2008). Part E: Risk Characterisation. European Chemicals Agency. Helsinki, Finland.
- ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment (2008). Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment. European Chemicals Agency. Helsinki, Finland.
- El-Temsah, Y.S. und Joner, E.J. (2012): Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environ Toxicol* 27 (1): 42-49.

- European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General (2002). Directorate E - Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions. Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology. Brüssel, Belgien.
- Farkas, J., Christian, P., Urrea, J.A., Roos, N., Hasselov, M., Tollefsen, K.E. und Thomas, K.V. (2010): Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol* 96 (1): 44-52.
- Farkas, J., Peter, H., Christian, P., Gallego Urrea, J.A., Hasselov, M., Tuoriniemi, J., Gustafsson, S., Olsson, E., Hylland, K. und Thomas, K.V. (2011): Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environ Int* 37 (6): 1057-1062.
- Geranio, L., Heuberger, M. und Nowack, B. (2009): The Behaviour of Silver Nanotextiles during Washing. *Environ Sci Technol* 43: 8113-8118.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W. und Nowack, B. (2009): Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environ Sci Technol* 43: 9216 - 9222.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W. und Nowack, B. (2010): Possibilities and limitations of modeling environmental exposure to engineered nanomaterials by probabilistic material flow analysis. *Environ Toxicol Chem* 29 (5): 1036-1048.
- Griffitt, R.J., Brown-Peterson, N.J., Savin, D.A., Manning, C.S., Boube, I., Ryan, R.A. und Brouwer, M. (2012): Effects of chronic nanoparticulate silver exposure to adult and juvenile sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Environ Toxicol Chem* 31 (1): 160-167.
- Handy, R.D., Cornelis, G., Fernandes, T., Tsyusko, O., Decho, A., Sabo-Attwood, T., Metcalfe, C., Steevens, J.A., Klaine, S.J., Koelmans, A.A. und Horne, N. (2012): Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench. *Environ Toxicol Chem* 31 (1): 15-31.
- Hänsch, M. und Emmerling, C. (2010): Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173 (4): 554-558.
- Heckmann, L.H., Hovgaard, M.B., Sutherland, D.S., Autrup, H., Besenbacher, F. und Scott-Fordsmand, J.J. (2011): Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology* 20 (1): 226-233.
- Hou, L., Li, K., Ding, Y., Li, Y., Chen, J., Wu, X. und Li, X. (2012): Removal of silver nanoparticles in simulated wastewater treatment processes and its impact on COD and NH(4) reduction. *Chemosphere* 87 (3): 248-252.

- Hund-Rinke, K., Marscheider-Weidemann, F. und Kemper, M. (2007). Beurteilung der Gesamtumweltexposition von Silberionen aus Biozid-Produkten, FKZ 36004020. Umweltbundesamt. Berlin, Deutschland.
- Hund-Rinke, K., Schlich, K. und Klawonn, T. (2012): Influence of application techniques on the ecotoxicological effects of nanomaterials in soil. *Environ Sci Eur* 24 (30).
- ISO Richtlinie 11466 (1995). Soil quality - Extraction of trace elements soluble in aqua regia. International Organization for Standardization. Genf, Schweiz.
- ISO Richtlinie 15685 (2004). Soil quality - Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification - Rapid test by ammonium oxidation. International Organization for Standardization. Genf, Schweiz.
- ISO Richtlinie 17512-1 (2008). Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). International Organization for Standardization. Genf, Schweiz.
- ISO Richtlinie 18512 (2007). Soil quality - Guidance on long and short term storage of soil samples, International Organization for Standardization, Genf, Schweiz.
- ISO/TS Richtlinie 22939 (2010). Soil quality - Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates. International Organization for Standardization. Genf, Schweiz.
- Kaegi, R., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Mueller, E., Vonbank, R., Boller, M. und Burkhardt, M. (2010): Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environ Pollut* 158 (9): 2900-2905.
- Kaegi, R., Voegelin, A., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Burkhardt, M. und Siegrist, H. (2011): Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol* 45 (9): 3902-3908.
- Kim, B., Park, C.-S., Murayama, M. und Hochella, M.F. (2010): Discovery and Characterization of Silver Sulfide Nanoparticles in Final Sewage Sludge Products. *Environ Sci Technol* 44 (19): 7509 - 7514.
- Kim, S.W., Nam, S.H. und An, Y.J. (2012): Interaction of silver nanoparticles with biological surfaces of *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol Environ Saf* 77: 64-70.
- Klein, C.L., Comero, S., Stahlmecke, B., Romazanov, J., Kuhlbusch, T.A.J., Doren, E.V., Temmerman, P.-J.D., Maat, J., Wick, P., Krug, H., Locoro, G., Hund-Rinke, K., Kördel, W., Friedrichs, S., Maler, G., Werner, J., Lingsinger, T. und Gawlik, B.M. (2011): NM-Series of Representative Manufactured Nanomaterials NM-300 Silver Characterisation, Stability, Homogeneity. *JRC Scientific and Technical Reports*.

- Lee, W.M., Kwak, J.I. und An, Y.J. (2012): Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* 86 (5): 491-499.
- Levard, C., Reinsch, B.C., Michel, F.M., Oumahi, C., Lowry, G.V. und Brown, G.E. (2011): Sulfidation processes of PVP-coated silver nanoparticles in aqueous solution: impact on dissolution rate. *Environ Sci Technol* 45 (12): 5260-5266.
- Liang, Z., Das, A. und Hu, Z. (2010): Bacterial response to a shock load of nanosilver in an activated sludge treatment system. *Water Res* 44 (18): 5432-5438.
- Liu, J., Pennell, K.G. und Hurt, R.H. (2011): Kinetics and mechanisms of nanosilver oxysulfidation. *Environ Sci Technol* 45 (17): 7345-7353.
- Lorenz, C., Windler, L., von Goetz, N., Lehmann, R.P., Schuppler, M., Hungerbühler, K., Heuberger, M. und Nowack, B. (2012): Characterization of silver release from commercially available functional (nano)textiles. *Chemosphere* 89 (7): 817-824.
- Lowry, G.V., Gregory, K.B., Apte, S.C. und Lead, J.R. (2012): Transformations of nanomaterials in the environment. *Environ Sci Technol* 46 (13): 6893-6899.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. und Kolmakov, A. (2010): Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci Total Environ* 408 (16): 3053-3061.
- Meyer, J.N., Lord, C.A., Yang, X.Y., Turner, E.A., Badireddy, A.R., Marinakos, S.M., Chilkoti, A., Wiesner, M.R. und Auffan, M. (2010): Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquat Toxicol* 100 (2): 140-150.
- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T. und Yacaman, M.J. (2005): The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16 (10): 2346-2353.
- Musante, C. und White, J.C. (2012): Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: Differential effects of nano and bulk-size particles. *Environmental Toxicology* 27 (9): 510-517.
- Nowack, B., Ranville, J.F., Diamond, S., Gallego-Urrea, J.A., Metcalfe, C., Rose, J., Horne, N., Koelmans, A.A. und Klaine, S.J. (2012): Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. *Environ Toxicol Chem* 31 (1): 50-59.
- OECD Richtlinie 208 (2006). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

- OECD Richtlinie 209 (1984). OECD Guidelines of the Testing of Chemicals. Test Guideline 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation), Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD Richtlinie 217 (2000). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test Guideline 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD Richtlinie 222 (2004). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andreii*), Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD Richtlinie 301F (1992). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 301: Ready Biodegradability, Part F: Manometric Respirometry, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD Richtlinie 303A (2001). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 303: Simulation Test - Aerobic Sewage Treatment -- A: Activated Sludge Units; B: Biofilms, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F. und Popovic, R. (2012): Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol Environ Saf* 78: 80-85.
- Ratte, H.T. (1999): Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environ Toxicol Chem* 18: 89 - 108.
- Robertz, M., Eckl, S., Muckenheim, T. und Webb, L. (1999): Kostengünstige Methode zur Bestimmung der mikrobiellen Bodenatmung nach DIN 19797. Applikationsbericht AL 99004, Kat.-Nr.418 394. Forschungszentrum Jülich.
- Rüdel, H., Kösters, J., Homrighausen, D. und Hansknecht, D. (2011). Richtlinie zur chemischen Analyse: Aufschluss von Umweltproben.
- Schlich, K., Klawonn, T., Terytze, K. und Hund-Rinke, K. (2013): Effects of silver nanoparticles and silver nitrate in the earthworm reproduction test. *Environ Toxicol Chem* 32 (1): 181-188.
- Shafer, M.M., Armstrong, D.E., Overdier, J.T. und Walker, M.T. (1998): Removal, partitioning and fate of silver and other metals in wastewater treatment plants and effluent-receiving streams. *Environ Toxicol Chem* 17: 630 - 641.
- Shin, Y.J., Kwak, J.I. und An, Y.J. (2012): Evidence for the inhibitory effects of silver nanoparticles on the activities of soil exoenzymes. *Chemosphere* 88 (4): 524-529.
- Shoults-Wilson, W.A., Reinsch, B.C., Tsyusko, O.V., Bertsch, P.M., Lowry, G.V. und Unrine, J.M. (2011b): Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*). *Nanotoxicology* 5 (3): 432-444.

- Shoults-Wilson, W.A., Reinsch, B.C., Tsyusko, O.V., Bertsch, P.M., Lowry, G.V. und Unrine, J.M. (2011c): Role of Particle Size and Soil Type in Toxicity of Silver Nanoparticles to Earthworms. *Soil Science Society of America Journal* 75 (2): 365.
- Shoults-Wilson, W.A., Zhurbich, O.I., McNear, D.H., Tsyusko, O.V., Bertsch, P.M. und Unrine, J.M. (2011a): Evidence for avoidance of Ag nanoparticles by earthworms (*Eisenia fetida*). *Ecotoxicology* 20 (2): 385-396.
- Som, C., Wick, P., Krug, H. und Nowack, B. (2011): Environmental and health effects of nanomaterials in nanotextiles and facade coatings. *Environ Int* 37 (6): 1131-1142.
- Technische Universität Dresden (2011). Standard Operating Procedure - Empfehlung zur Herstellung und Handhabung von Silbernanopartikel-Suspensionen.
- Tiede, K., Boxall, A.B.A., Wang, X., Gore, D., Tiede, D., Baxter, M., David, H., Tear, S.P. und Lewis, J. (2010): Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25 (7): 1149.
- Tourinho, P.S., van Gestel, C.A., Lofts, S., Svendsen, C., Soares, A.M. und Loureiro, S. (2012): Metal-based nanoparticles in soil: fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environ Toxicol Chem* 31 (8): 1679-1692.
- ToxRat Solutions GmbH (Online Version 2.09 und 2.10): ToxRat Professional - Statistische Auswertung von Biotests.
- Tsyusko, O.V., Hardas, S.S., Shoults-Wilson, W.A., Starnes, C.P., Joice, G., Butterfield, D.A. und Unrine, J.M. (2012): Short-term molecular-level effects of silver nanoparticle exposure on the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ Pollut* 171: 249-255.
- United States Environmental Protection Agency (2009). Targeted National Sewage Sludge Survey Statistical Analysis Report Veröffentlicht auf [http://water.epa.gov/scitech/wastetech/biosolids/upload/TNSSS\\_stat\\_appendix-A-Apr-2009.pdf](http://water.epa.gov/scitech/wastetech/biosolids/upload/TNSSS_stat_appendix-A-Apr-2009.pdf).
- Wang, Y., Westerhoff, P. und Hristovski, K.D. (2012): Fate and biological effects of silver, titanium dioxide, and C60 (fullerene) nanomaterials during simulated wastewater treatment processes. *J Hazard Mater* 201-202: 16-22.
- Wiechmann, B., Dienemann, C., Kabbe, C., Brandt, S., Vogel, I. und Roskoch, A. (2012): Klärschlammentsorgung in der Bundesrepublik Deutschland.
- Woodrow Wilson International Center for Scholars (2011). Project on Emerging Nanotechnologies. Consumer Products Inventory of Nanotechnology Products. [www.nanotechproject.org/inventories/consumer](http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer).
- Yang, Y., Chen, Q., Wall, J.D. und Hu, Z. (2012): Potential nanosilver impact on anaerobic digestion at moderate silver concentrations. *Water Res* 46 (4): 1176-1184.

Yin, L., Colman, B.P., McGill, B.M., Wright, J.P. und Bernhardt, E.S. (2012): Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. *PLoS One* 7 (10): e47674.

Yuan, G. und Cranston, R. (2008): Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles. *Textile Research Journal* 78 (1): 60-72.

## **13 Anhang**

### **13.1 Anhang zu Kapitel 5**

**„Untersuchung von NM-300K und AgNO<sub>3</sub> nach Richtlinie - Wirkung im terrestrischen Ökosystem und auf Klärschlamm“**

**Tabelle 57: Kläranlagensimulation mit AgNO<sub>3</sub> - Begleitanalytik**

Versuchstag	TS-Gehalt [g/L]	pH im Einlauf	pH im Auslauf	pH Nitrifikations- becken	Nitrat im Auslauf [mg/L]	Ammonium im Auslauf [mg/L]	Nitrit im Auslauf [mg/L]
<b>Anlage 1: Kontrolle</b>							
D-2	2,6	7,8	7,9	7,6	n.b.	n.b.	n.b.
D0	2,7	7,6	7,6	7,5	10,8	3,1	43,2
D4	3,3	7,5	7,6	7,4	n.b.	n.b.	n.b.
D6	4,1	7,2	7,1	7,0	n.b.	n.b.	n.b.
D10	3,1	7,2	7,0	6,9	12,4	0,3	20,0
<b>Anlage 2: 1 mg/L</b>							
D-2	2,7	7,8	7,8	7,6	n.b.	n.b.	n.b.
D0	2,8	7,4	7,4	7,2	19,9	1,0	12,0
D4	3,2	7,2	7,1	6,8	n.b.	n.b.	n.b.
D6	2,1	7,0	7,2	7,0	n.b.	n.b.	n.b.
D10	2,2	7,1	7,0	7,1	5,8	3,2	0,9

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 57

Versuchstag	TS-Gehalt [g/L]	pH im Einlauf	pH im Auslauf	pH Nitrifikations- becken	Nitrat im Auslauf [mg/L]	Ammonium im Auslauf [mg/L]	Nitrit im Auslauf [mg/L]
<b>Anlage 3: 2 mg/L</b>							
D-2	3,2	7,9	7,8	7,8	n.b.	n.b.	n.b.
D0	2,6	7,4	7,2	7,2	14,6	0,9	16,0
D4	3,2	7,2	7,0	6,9	n.b.	n.b.	n.b.
D6	2,8	7,2	6,9	6,8	n.b.	n.b.	n.b.
D10	3,1	7,1	6,8	6,8	11,6	1,0	8,2
<b>Anlage 4: 4 mg/L</b>							
D-2	2,7	7,8	7,8	7,7	n.b.	n.b.	n.b.
D0	3,0	7,5	7,4	7,5	7,9	4,8	39,2
D4	3,4	7,8	7,5	7,8	n.b.	n.b.	n.b.
D6	3,1	7,7	7,5	7,7	n.b.	n.b.	n.b.
D10	2,2	7,8	7,5	7,6	3,9	32,0	4,8

n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 58: Kläranlagensimulation mit AgNO<sub>3</sub> - DOC-Elimination

Kläranlage	Phase	Zeitpunkt	DOC Einlauf [mg/L]	DOC Auslauf [mg/L]	DOC Elimination [%]
<b>Anlage 1: Kontrolle</b>	Vorlauf	D-3	129	8	94
		D-2	147	9	94
		D-1	143	8	95
	Haupttest	D0	159	31	80
		D1	173	27	84
		D2	176	23	87
		D3	176	23	87
		D4	141	17	88
		D5	122	17	86
		D6	128	15	88
		D7	121	13	90
		D10	142	12	92
		<b>Anlage 2: 1 mg/L</b>	Vorlauf	D-3	134
D-2	135			8	94
D-1	132			7	95
Haupttest	D0		154	26	83
	D1		155	22	86
	D2		149	16	89
	D3		149	16	89
	D4		121	10	92
	D5		122	10	92
	D6		118	9	92
	D7		118	9	92
	D10		126	16	88

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 58

Kläranlage	Phase	Zeitpunkt	DOC Einlauf [mg/L]	DOC Auslauf [mg/L]	DOC Elimination [%]
<b>Anlage 3: 2 mg/L</b>	Vorlauf	D-3	147	18	88
		D-2	147	18	88
		D-1	131	7	95
	Haupttest	D0	156	31	80
		D1	153	29	81
		D2	147	24	84
		D3	147	24	84
		D4	128	15	88
		D5	133	16	88
		D6	119	15	88
		D7	116	13	89
		D10	115	13	88
		<b>Anlage 4: 4 mg/L</b>	Vorlauf	D-3	144
D-2	144			12	92
D-1	143			8	95
Haupttest	D0		160	30	81
	D1		155	30	81
	D2		151	35	77
	D3		151	35	77
	D4		130	37	71
	D5		128	49	62
	D6		128	50	61
	D7		123	50	59
	D10		120	58	52

**Tabelle 59: Kläranlagensimulation mit NM-300K - Begleitanalytik**

Versuchstag	TS-Gehalt Nitrifikations- becken [g/L]	pH im Einlauf	pH im Auslauf	pH im Nitrifikations- becken	Nitrat im Auslauf [mg/L]	Ammonium im Auslauf [mg/L]	Nitrit im Auslauf [mg/L]
<b>Anlage 1: Kontrolle</b>							
D-4	2,4	7,4	7,0	6,5	25,0	0,7	8,2
D-2	2,9	7,7	7,0	6,6	27,4	0,7	11,7
D0	3,1	8,0	7,5	7,2	22,1	5,5	11,4
D4	2,2	7,7	7,5	7,4	13,9	5,5	9,5
D7	2,5	7,5	7,4	7,2	9,0	2,8	19,8
D10	2,6	7,7	7,6	7,4	n.b.	n.b.	n.b.
D13	3,0	7,8	7,2	7,0	5,8	3,0	9,6
D16	2,4	7,7	7,0	7,0	n.b.	n.b.	n.b.
<b>Anlage 2: 1 mg/L</b>							
D-4	2,2	7,7	7,0	6,5	27,3	0,5	6,8
D-2	2,7	7,8	7,0	6,6	30,2	0,6	9,6
D0	3,3	8,0	7,5	7,1	21,8	5,6	11,5
D4	2,2	7,7	7,4	7,4	13,9	5,6	14,7
D7	2,6	7,5	7,4	7,3	20,3	4,6	48,2
D10	2,5	7,7	7,0	6,8	n.b.	n.b.	n.b.
D13	2,9	7,8	7,1	7,1	22,2	2,0	28,6
D16	2,4	7,7	7,2	7,0	n.b.	n.b.	n.b.

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 59

Versuchstag	TS Gehalt Nitrifikations- becken [g/L]	pH im Einlauf	pH im Auslauf	pH im Nitrifikations- becken	Nitrat im Auslauf [mg/L]	Ammonium im Auslauf [mg/L]	Nitrit im Auslauf [mg/L]
<b>Anlage 3: 4 mg/L</b>							
D-4	1,6	7,4	7,0	6,6	24,3	0,5	2,1
D-2	2,5	7,8	7,0	6,6	25,6	0,7	23,2
D0	2,9	8,0	7,7	7,2	10,5	4,0	12,9
D4	2,6	7,7,	7,4	7,3	10,4	5,2	16,9
D7	3,1	7,5	7,5	7,4	13,9	2,2	67,0
D10	3,0	7,6	6,9	6,7	n.b.	n.b.	n.b.
D13	3,5	7,7	7,1	6,9	16,5	1,8	51,2
D16	3,8	7,7	7,1	7,1	n.b.	n.b.	n.b.
<b>Anlage 4: 16 mg/L</b>							
D-4	2,8	7,7	7,0	6,5	27,8	6,8	0,7
D-2	3,2	7,7	7,0	6,6	27,7	12,8	0,6
D0	3,2	8,0	7,7	7,1	17,2	11,2	5,7
D4	2,3	7,7	7,4	7,2	8,2	14,6	5,3
D7	2,5	7,5	7,4	7,3	14,3	63,0	2,6
D10	1,6	7,7	7,0	6,8	n.b.	n.b.	n.b.
D13	2,2	7,8	7,0	7,0	12,1	42,4	8,0
D16	2,5	7,8	7,1	7,0	n.b.	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 60: Kläranlagensimulation mit NM-300K - DOC-Elimination in Anlage 1

Phase	Zeitpunkt	DOC Einlauf [mg/L]	DOC Auslauf [mg/L]	DOC Elimination [%]
<b>Vorlauf</b>	D-5	96	5	95
	D-4	90	5	94
	D-3	91	5	95
	D-2	102	6	94
	D-1	106	6	94
<b>Haupttest</b>	D0	112	8	93
	D1	105	8	92
	D2	122	4	97
	D3	114	4	96
	D4	112	4	96
	D5	110	4	96
	D6	109	4	96
	D7	114	4	96
	D8	117	4	97
	D9	111	5	95
	D10	110	4	96
	D11	109	4	96
	D12	111	4	96
	D13	109	4	96
	D14	105	4	96
	D15	111	5	95
D16	96	5	95	

Tabelle 61: Kläranlagensimulation mit NM-300K - DOC-Elimination in Anlage 2

Phase	Zeitpunkt	DOC Einlauf [mg/L]	DOC Auslauf [mg/L]	DOC Elimination [%]
<b>Vorlauf</b>	D-5	90	5	94
	D-4	99	5	95
	D-3	111	5	95
	D-2	103	6	94
	D-1	110	7	94
<b>Haupttest</b>	D0	116	10	91
	D1	111	10	91
	D2	120	5	96
	D3	111	3	97
	D4	108	4	96
	D5	104	3	97
	D6	115	4	97
	D7	110	4	96
	D8	120	4	97
	D9	117	3	97
	D10	112	3	97
	D11	114	3	97
	D12	114	3	97
	D13	114	3	97
	D14	107	4	96
	D15	112	4	96
D16	90	5	94	

Tabelle 62: Kläranlagensimulation mit NM-300K - DOC-Elimination in Anlage 3

Phase	Zeitpunkt	DOC Einlauf [mg/L]	DOC Auslauf [mg/L]	DOC Elimination [%]
<b>Vorlauf</b>	D-5	92	5	95
	D-4	92	5	95
	D-3	117	9	92
	D-2	108	6	94
	D-1	112	7	94
<b>Haupttest</b>	D0	115	12	90
	D1	117	11	91
	D2	121	5	96
	D3	115	4	97
	D4	106	4	96
	D5	114	4	96
	D6	110	4	96
	D7	118	5	96
	D8	121	5	96
	D9	119	4	97
	D10	113	4	96
	D11	118	5	96
	D12	118	4	97
	D13	116	4	97
	D14	113	4	96
	D15	110	4	96
D16	92	5	95	

Tabelle 63: Kläranalagensimulation mit NM-300K - DOC-Elimination in Anlage 4

Phase	Zeitpunkt	DOC Einlauf [mg/L]	DOC Auslauf [mg/L]	DOC Elimination [%]
<b>Vorlauf</b>	D-5	105	6	94
	D-4	93	6	94
	D-3	110	6	95
	D-2	108	7	94
	D-1	110	7	94
	<b>Haupttest</b>	D0	112	11
D1		131	17	87
D2		124	10	92
D3		119	13	89
D4		118	13	89
D5		122	24	80
D6		114	18	84
D7		122	19	84
D8		128	14	89
D9		124	10	92
D10		123	14	89
D11		124	13	90
D12		124	14	89
D13		125	13	90
D14		119	12	90
D15		120	9	93
D16	105	6	94	

## **13.2 Anhang zu Kapitel 7**

**„Realistisches Nutzungsszenario – Wirkung von AgNP-haltigem Klärschlamm als landwirtschaftlicher Dünger auf die Bodenmikroorganismen“**

**Tabelle 64: Langzeitversuch 1 – Potentielle Ammoniumoxidation**

		Kontrolle (K)	Klärschlamm- kontrolle (KK)	1,6 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (NM-300K)	2,1 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )	4,0 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 11</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ g TM * h]	36,1	20,5	8,9	7,6	18,4	12,2
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	1,3	4,4	6,1	8,8	2,2	5,6
	CV <sup>b</sup> [%]	3,7	21,5	68,1	116,9	11,8	46,2
	Hemmung [%] (auf K)	-	43,4**	78,2	81,5	55,0	70,2
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	56,5*	63,1*	10,3	40,6*
<b>Tag 32</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ g TM * h]	47,8	62,7	61,1	63,1	63,9	62,6
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	2,8	9,6	5,9	7,0	5,0	5,3
	CV <sup>b</sup> [%]	5,9	15,4	9,7	11,1	7,8	8,5
	Hemmung [%] (auf K)	-	-31,1*	-27,8	-32,0	-33,6	-30,8
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	2,5	-0,6	-1,9	0,2
<b>Tag 60</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ g TM * h]	85,5	97,1	102,5	91,9	101,3	88,5
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	4,4	6,5	8,3	5,1	4,1	3,9
	CV <sup>b</sup> [%]	5,2	6,7	8,1	5,5	4,1	4,4
	Hemmung [%] (auf K)	-	-13,6*	-19,9	-7,6	-18,5	-3,6
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-5,5	5,3	-4,3	8,9*

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 64

		Kontrolle (K)	Klärschlamm- kontrolle (KK)	1,6 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (NM-300K)	2,1 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )	4,0 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 100</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ g TM * h]	51,3	67,6	59,6	45,2	58,9	39,7
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	6,7	8,7	6,4	8,2	5,5	3,3
	CV <sup>b</sup> [%]	13,0	12,9	10,7	18,1	9,3	8,4
	Hemmung [%] (auf K)	-	-31,9*	-16,3	11,9	-15,0	22,6
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	11,8	33,2**	12,8*	41,3***
<b>Tag 180</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ g TM * h]	46,8	38,7	27,7	18,8	24,0	5,6
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	3,51	0,8	2,7	15,1	3,6	2,4
	CV <sup>b</sup> [%]	7,5	2,12	9,78	80,44	15,01	43,30
	Hemmung [%] (auf K)	-	17,4**	40,9	59,8	48,7	88,0
	Hemmung [%] (auf KK)	-		28,4	51,4**	37,9*	85,5***

<sup>a</sup> Standardabweichung; <sup>b</sup> Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 65: Langzeitversuch 1 - C-Transformation**

		<b>Kontrolle (K)</b>	<b>Klärschlamm- Kontrolle (KK)</b>	<b>1,6 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>3,4 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>2,1 mg/kg TM (AgNO<sub>3</sub>)</b>	<b>4,0 mg/kg TM (AgNO<sub>3</sub>)</b>
<b>Tag 11</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	83,0	95,3	89,8	84,3	89,8	89,8
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	12,1	21,5	18,4	11,5	18,4	18,4
	CV <sup>b</sup> [%]	14,6	22,6	20,5	13,7	20,5	20,5
	Hemmung [%] (auf K)	-	-14,8	-22,9	-15,4	-22,9	-22,9
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	5,8	11,5	5,8	5,8
<b>Tag 32</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	67,3	67,0	72,8	72,8	78,5	78,5
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,5	0,0	11,5	11,5	13,3	13,3
	CV [%]	0,7	0,0	15,8	15,8	16,9	16,9
	Hemmung [%] (auf K)	-	0,4	-8,2	-8,2	-16,7	-16,7
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-8,6	-8,6	-17,2	-17,2
<b>Tag 60</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	72,8	78,5	78,3	73,0	72,8	61,5
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	11,5	13,3	22,5	21,6	11,5	11,0
	CV [%]	15,8	16,9	28,8	29,6	15,8	17,9
	Hemmung [%] (auf K)	-	-7,9	-7,6	-0,3	0,0	15,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	0,3	7,0	7,3	21,7*

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 65

		Kontrolle (K)	Klärschlamm- kontrolle (KK)	1,6 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (NM-300K)	2,1 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )	4,0 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 100</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	67,8	73,0	52,3	56,0	56,0	50,5
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,5	21,6	12,7	12,7	12,7	11,0
	CV [%]	0,7	29,6	24,3	22,7	22,7	21,8
	Hemmung [%] (auf K)	-	-7,7	22,8	17,3	17,3	25,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	28,3	23,3	23,3	30,8*
<b>Tag 180</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	45,7	40,3	23,3	23,0	23,0	23,0
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,6	11,5	0,5	0,0	0,0	0,0
	CV [%]	1,3	28,6	2,2	0,0	0,0	0,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	11,9	49,1	49,6	49,6	49,6
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	42,2***	42,9***	42,9***	42,9***

<sup>a</sup> Standardabweichung; <sup>b</sup> Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 66: Langzeitversuch 1 – Mikrobielle Bodendiversität (Enzymaktivität)**

Versuchstag	Substrat	Element	Freisetzung von MUF/AMC [ $\mu\text{mol/L} \cdot (\text{g TM} \cdot \text{h})^{-1}$ ] $\pm$ Stabw. <sup>a</sup>					
			Kontrolle (K)	Klärschlammkontrolle (KK)	1,6 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (NM-300K)	2,1 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )	4,0 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>D32</b>	4-MUF- $\beta$ -D-glucoopyranosid	Kohlenstoff	926 $\pm$ 396	1181 $\pm$ 411	1176 $\pm$ 354	1446 $\pm$ 202	1866 $\pm$ 648*	1267 $\pm$ 255
	4-MUF-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid	Kohlenstoff	360 $\pm$ 128	791 $\pm$ 444	745 $\pm$ 261	809 $\pm$ 181	956 $\pm$ 263	1239 $\pm$ 1032
	bis-(4-MUF)-phosphat	Phosphor	891 $\pm$ 89	896 $\pm$ 169	1006 $\pm$ 113	891 $\pm$ 282	1053 $\pm$ 187	879 $\pm$ 196
	4-MUF-phosphat	Phosphor	3608 $\pm$ 694	3865 $\pm$ 246	4499 $\pm$ 309	4773 $\pm$ 600*	4672 $\pm$ 669*	4185 $\pm$ 250
	L-Leucin-AMC	Stickstoff	576 $\pm$ 59	774 $\pm$ 34	1033 $\pm$ 52***	1027 $\pm$ 89***	878 $\pm$ 17*	767 $\pm$ 50
	L-Alanin-AMC	Stickstoff	886 $\pm$ 145	1256 $\pm$ 223	1483 $\pm$ 29*	1716 $\pm$ 197**	1378 $\pm$ 103	1180 $\pm$ 49
	<b>D100</b>	4-MUF- $\beta$ -D-glucoopyranosid	Kohlenstoff	1086 $\pm$ 180	893 $\pm$ 734	1286 $\pm$ 190	1438 $\pm$ 512	1402 $\pm$ 431
4-MUF-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid		Kohlenstoff	403 $\pm$ 177	1400 $\pm$ 344	471 $\pm$ 183	438 $\pm$ 251	561 $\pm$ 280	392 $\pm$ 348
bis-(4-MUF)-phosphat		Phosphor	890 $\pm$ 189	891 $\pm$ 379	960 $\pm$ 283	848 $\pm$ 356	1228 $\pm$ 286	827 $\pm$ 142
4-MUF-phosphat		Phosphor	5322 $\pm$ 511	4732 $\pm$ 534	6299 $\pm$ 1114	5993 $\pm$ 967	5557 $\pm$ 1070	5426 $\pm$ 681
L-Leucin-AMC		Stickstoff	539 $\pm$ 44	729 $\pm$ 96	751 $\pm$ 153	575 $\pm$ 57	668 $\pm$ 131	458 $\pm$ 17
L-Alanin-AMC		Stickstoff	777 $\pm$ 40	1016 $\pm$ 142	916 $\pm$ 180	900 $\pm$ 68	887 $\pm$ 110	691 $\pm$ 34

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05  $\geq$  p > 0,01; \*\* 0,01  $\geq$  p > 0,001; \*\*\* p  $\leq$  0,001

**Tabelle 67: Langzeitversuch 2 - Begleitanalytik der Kläranlagensimulation**

<b>Anlage</b>	<b>Versuchstag</b>	<b>TS-Gehalt Denitrifikation [g/L]</b>	<b>TS-Gehalt Nitrifikation [g/L]</b>	<b>pH Einlauf</b>	<b>pH Auslauf</b>	<b>pH Denitrifikation</b>	<b>pH Nitrifikation</b>	<b>Nitrat im Auslauf [mg/L]</b>	<b>Ammonium im Auslauf [mg/L]</b>	<b>Nitrit im Auslauf [mg/L]</b>
<b>Anlage 1: Kontrolle</b>	D1	4,1	3,2	7,8	7,1	7,3	7,5	10,5	3,6	3,8
	D3	n.b.	n.b.	8,0	7,5	7,7	7,7	n.b.	n.b.	n.b.
	D5	4,4	4,1	8,0	7,5	7,7	7,3	10,1	1,4	3,2
	D8	n.b.	n.b.	7,9	7,6	7,5	7,4	n.b.	n.b.	n.b.
	D10	5,3	5,3	7,9	7,5	7,5	7,4	7,2	3,6	4,3
<b>Anlage 2: 0,4 mg/L (NM-300K)</b>	D1	4,1	3,3	7,8	7,1	7,3	7,7	8,7	4,2	5,0
	D3	n.b.	n.b.	8,0	7,5	7,6	7,3	n.b.	n.b.	n.b.
	D5	4,4	3,7	8,0	7,5	7,6	7,3	8,4	2,6	4,5
	D8	n.b.	n.b.	7,8	7,6	7,3	7,3	n.b.	n.b.	n.b.
	D10	4,4	4,4	7,8	7,6	7,3	7,3	6,8	3,6	3,5
<b>Anlage 3: 4 mg/L (NM-300K)</b>	D1	4,4	3,3	7,9	7,1	7,4	7,7	12,2	1,6	5,0
	D3	n.b.	n.b.	8,0	7,4	7,6	7,2	n.b.	n.b.	n.b.
	D5	4,9	4,8	8,0	7,4	7,6	7,2	11,5	1,0	4,9
	D8	n.b.	n.b.	7,8	7,4	7,2	7,1	n.b.	n.b.	n.b.
	D10	5,6	5,1	7,8	7,3	7,2	7,1	9,7	1,0	3,3

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 67

Anlage	Versuchstag	TS-Gehalt Denitrifikation [g/L]	TS-Gehalt Nitrifikation [g/L]	pH Einlauf	pH Auslauf	pH Denitrifikation	pH Nitrifikation	Nitrat im Auslauf [mg/L]	Ammonium im Auslauf [mg/L]	Nitrit im Auslauf [mg/L]
<b>Anlage 4: 9 mg/L (NM-300K)</b>	D1	4,9	3,4	7,8	7,2	7,3	7,7	13,5	1,6	2,9
	D3	n.b.	n.b.	8,0	7,4	7,6	7,2	n.b.	n.b.	n.b.
	D5	5,3	5,2	8,0	7,4	7,6	7,2	12,9	0,8	3,8
	D8	n.b.	n.b.	7,8	7,4	7,2	7,2	n.b.	n.b.	n.b.
	D10	5,5	5,8	7,9	7,3	7,2	7,2	10,5	1,2	2,5
<b>Anlage 5: 0,4 mg/L (AgNO<sub>3</sub>)</b>	D1	4,4	3,7	7,8	7,1	7,2	7,7	17,7	1,0	1,4
	D3	n.b.	n.b.	8,0	7,3	7,4	7,1	n.b.	n.b.	n.b.
	D5	4,2	4,2	8,0	7,3	7,4	7,1	20,0	0,4	1,1
	D8	n.b.	n.b.	7,9	7,3	7,0	7,0	n.b.	n.b.	n.b.
	D10	4,2	4,4	7,9	7,3	7,0	7,0	18,8	0,6	1,3

n.b.: nicht bestimmt

**Tabelle 68: Langzeitversuch 2 - DOC-Elimination bei der Kläranlagensimulation**

Anlage	Phase	Zeitpunkt	DOC Einlauf [mg/L]	DOC Auslauf [mg/L]	DOC Elimination [%]
<b>Anlage 1(Kontrolle)</b>	Vorlauf	D-1	128	4	97
	Haupttest	D0	127	3	98
		D2	123	4	97
		D3	118	3	97
		D5	119	3	97
		D8	118	3	97
		D9	99	3	97
		D10	121	3	98
<b>Anlage 2: 0,4 mg/L (NM-300K)</b>	Vorlauf	D-1	123	3	98
	Haupttest	D0	131	3	98
		D2	131	4	97
		D3	125	3	98
		D5	128	3	98
		D8	125	3	98
		D9	106	4	96
		D10	114	3	97
<b>Anlage 3: 4,0 mg/L (NM-300K)</b>	Vorlauf	D-1	120	1	99
	Haupttest	D0	120	3	98
		D2	119	4	97
		D3	120	3	98
		D5	114	3	97
		D8	110	4	96
		D9	103	4	96
		D10	107	3	97

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 68

Anlage	Phase	Zeitpunkt	DOC Einlauf [mg/L]	DOC Auslauf [mg/L]	DOC Elimination [%]		
<b>Anlage 4: 9,0 mg/L (NM-300K)</b>	Vorlauf	D-1	122	4	97		
	Haupttest	D0	132	3	98		
		D2	124	6	95		
		D3	122	4	97		
		D5	119	5	96		
		D8	119	5	96		
		D9	110	5	95		
		D10	110	4	96		
		<b>Anlage 5: 0,4 mg/L (AgNO<sub>3</sub>)</b>	Vorlauf	D-1	108	3	97
			Haupttest	D0	125	3	98
D2	150			3	98		
D3	107			3	97		
D5	97			3	97		
D8	100			3	97		
D9	111			3	97		
D10	112			3	97		

**Tabelle 69: Langzeitversuch 2 - Potentielle Ammoniumoxidation**

		<b>Kontrolle (K)</b>	<b>Klärschlamm- kontrolle (KK)</b>	<b>2,8 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>19,0 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>46,8 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>2,5 mg/kg TM (AgNO<sub>3</sub>)</b>
<b>Tag 11</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	41,6	6,5	4,3	1,8	5,8	1,9
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	2,7	7,2	4,7	3,5	6,8	3,9
	CV <sup>b</sup> [%]	6,5	110,8	108,7	200,0	116,5	200,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	84,4 <sup>***</sup>	89,7	95,8	85,9	95,3
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	33,8	73,1	10,1	70,0
<b>Tag 32</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	59,0	44,5	29,5	48,2	15,1	35,7
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	6,7	6,8	5,6	6,5	5,2	14,6
	CV <sup>b</sup> [%]	11,3	15,3	19,0	13,6	34,7	41,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	24,5 <sup>*</sup>	50,0	18,2	74,4	39,4
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	33,7 <sup>**</sup>	-8,4	66,1 <sup>***</sup>	19,8
<b>Tag 60</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	40,0	47,3	34,5	14,6	6,7	49,8
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	5,5	3,9	5,9	10,6	5,9	10,5
	CV <sup>b</sup> [%]	13,9	8,2	17,1	72,6	87,6	21,1
	Hemmung [%] (auf K)	-	-18,0 <sup>*</sup>	13,9	63,6	83,1	-24,4
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	27,0 <sup>**</sup>	69,2 <sup>***</sup>	85,7 <sup>***</sup>	-5,4

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 69

		Kontrolle (K)	Klärschlamm- kontrolle (KK)	2,8 mg/kg TM (NM-300K)	19,0 mg/kg TM (NM-300K)	46,8 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 100</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	48,6	40,2	28,9	5,1	4,5	32,6
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	3,9	5,7	7,8	4,0	4,1	10,1
	CV <sup>b</sup> [%]	8,0	14,3	26,9	78,8	89,2	30,8
	Hemmung [%] (auf K)	-	17,3*	40,4	89,5	90,6	32,9
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	28,0**	87,3***	88,7***	18,9
<b>Tag 140</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	44,0	31,3	10,8	0,3	2,2	5,4
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	1,1	4,0	2,4	0,6	4,3	6,1
	CV <sup>b</sup> [%]	2,5	12,8	22,3	200,0	200,0	113,4
	Hemmung [%] (auf K)	-	28,9***	75,4	99,3	95,1	87,7
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	65,4***	99,0***	93,1***	82,7***

<sup>a</sup> Standardabweichung; <sup>b</sup> Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 70: Langzeitversuch 2 - C-Transformation**

		<b>Kontrolle (K)</b>	<b>Klärschlamm- kontrolle (KK)</b>	<b>2,8 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>19,0 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>46,8 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>2,5 mg/kg TM (AgNO<sub>3</sub>)</b>
<b>Tag 11</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	90,7	151,8	151,8	129,3	95,5	118,0
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,6	21,5	21,5	11,5	11,0	21,6
	CV [%]	0,64	14,2	14,2	8,9	11,5	18,3
	Hemmung [%] (auf K)	-	-67,4**	-67,4	-42,6	-5,3	-30,1
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	0,0	14,8*	37,1***	22,2**
<b>Tag 32</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	95,5	123,5	129,3	95,3	74,7	67,3
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	11,0	13,3	11,5	21,5	13,3	18,4
	CV [%]	11,5	10,8	8,9	22,6	17,8	27,3
	Hemmung [%] (auf K)	-	-29,3**	-35,3	0,3	21,8	29,6
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-4,7	22,9*	39,5***	45,5***
<b>Tag 60</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	74,7	61,5	61,5	59,7	39,3	67,0
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	13,3	11,0	11,0	12,7	11,5	0,0
	CV [%]	17,8	17,9	17,9	21,3	29,3	0,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	17,6*	17,6	20,1	47,4	10,3
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	0,0	3,0	36,2**	-8,9

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 70

		<b>Kontrolle (K)</b>	<b>Klärschlamm- kontrolle (KK)</b>	<b>2,8 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>19,0 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>46,8 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>2,5 mg/kg TM (AgNO<sub>3</sub>)</b>
<b>Tag 100</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	67,3	37,3	44,8	44,7	22,0	50,5
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,6	13,3	18,4	22,5	0,0	11,0
	CV [%]	0,9	35,6	41,1	50,4	0,0	21,8
	Hemmung [%] (auf K)	-	44,6**	33,5	33,7	67,3	25,0
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-19,9	-19,6	41,1	-35,3
<b>Tag 140</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	45,3	56,8	34,3	23,0	22,0	45,0
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,6	13,0	22,5	0,0	0,0	0,0
	CV [%]	1,3	22,9	65,7	0,0	0,0	0,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	-25,2	24,4	49,3	51,5	0,7
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	39,6**	59,5**	61,2***	20,7

<sup>a</sup> Standardabweichung; <sup>b</sup> Variationskoeffizient;

**Tabelle 71: Langzeitversuch 2 - Basalatmung**

		Kontrolle	Klärschlamm- kontrolle	2,8 mg/kg TM (NM-300K)	19,0 mg/kg TM (NM-300K)	46,8 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
Tag 32	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,53	1,10	1,10	1,08	1,08	0,80
	SD <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,06	0,16	0,08	0,21	0,15	0,08
	CV <sup>b</sup> [%]	10,8	14,9	7,4	19,2	14,0	10,2
	Hemmung [%] (auf K)	-	-106,3***	-106,3	-101,6	-101,6	-50,0
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	0,0	2,3	2,3	27,3**
Tag 60	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,30	0,45	0,25	0,30	0,20	0,27
	SD <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,00	0,10	0,10	0,00	0,00	0,06
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	22,2	40,0	0,0	0,0	21,7
	Hemmung [%] (auf K)	-	-50,0*	16,7	0,0	33,3	11,1
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	44,4**	33,3*	55,6***	40,7*

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 71

		Kontrolle	Klärschlamm- kontrolle	2,8 mg/kg TM (NM-300K)	19,0 mg/kg TM (NM-300K)	46,8 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 100</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,40	0,45	0,43	0,45	0,30	0,15
	SD <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,00	0,10	0,13	0,10	0,00	0,10
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	22,2	29,6	22,2	0,0	66,7
	Hemmung [%] (auf K)	-	-12,5	-6,2	-12,5	25,0	62,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	5,6	0,0	33,3*	66,7***
<b>Tag 140</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,38	0,50	0,35	0,28	0,15	0,25
	SD <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,05	0,00	0,06	0,13	0,10	0,10
	CV <sup>b</sup> [%]	13,3	0,0	16,5	45,8	66,7	40,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	-33,3	6,7	26,7	60,0	33,3
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	30,0*	45,0**	70,0***	50,0***

<sup>a</sup> Standardabweichung; <sup>b</sup> Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Tabelle 72: Langzeitversuch 3 - Potentielle Ammoniumoxidation

		Kontrolle (K)	Klärschlammkontrolle (KK)	2,8 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 11</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM*h]	43,4	29,8	36,2	30,3
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	5,4	6,6	3,3	10,6
	CV <sup>b</sup> [%]	12,4	22,2	9,2	34,9
	Hemmung [%] (auf K)	-	31,3**	16,7	30,3
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-21,4	-1,5
<b>Tag 32</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM*h]	41,6	54,0	51,9	40,9
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	2,0	8,5	6,1	3,1
	CV <sup>b</sup> [%]	4,8	15,7	11,7	7,6
	Hemmung [%] (auf K)	-	-29,7	-24,7	1,7
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	3,9	24,2**
<b>Tag 60</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM*h]	49,9	54,5	63,2	48,0
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	6,9	12,3	4,3	13,3
	CV <sup>b</sup> [%]	13,9	22,5	6,8	27,7
	Hemmung [%] (auf K)	-	-9,1	-26,6	3,9
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-16,0	12,0
<b>Tag 100</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM*h]	47,8	55,9	64,0	49,3
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	5,3	7,2	15,2	12,4
	CV <sup>b</sup> [%]	11,2	12,9	23,8	25,1
	Hemmung [%] (auf K)	-	-17,1	-34,1	-3,3
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-14,6	11,7
<b>Tag 140</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM*h]	45,3	61,6	58,1	60,4
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	4,5	7,0	6,0	5,4
	CV <sup>b</sup> [%]	9,9	11,3	10,3	8,9
	Hemmung [%] (auf K)	-	-36,0**	-28,4	-33,4
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	5,6	1,9

<sup>a</sup>Standardabweichung; <sup>b</sup>Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Tabelle 73: Langzeitversuch 3 - C-Transformation

		Kontrolle (K)	Klärschlammkontrolle (KK)	2,8 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 11</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	84,3	112,0	101,0	101,0
	Stabw. <sup>a</sup> [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	11,5	0,8	12,7	12,7
	CV <sup>b</sup> [%]	13,6	0,7	12,6	12,6
	Hemmung [%] (auf K)	-	-32,9**	-19,9	-19,9
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	9,8	9,8
<b>Tag 32</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	68,0	78,5	61,5	72,8
	Stabw. <sup>a</sup> [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	1,2	13,3	11,0	11,5
	CV <sup>b</sup> [%]	1,7	16,9	17,9	15,8
	Hemmung [%] (auf K)		-15,4	9,6	-7,0
	Hemmung [%] (auf KK)			21,7*	7,3
<b>Tag 60</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	97,3	61,5	50,5	56,0
	Stabw. <sup>a</sup> [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	12,7	11,0	11,0	12,7
	CV <sup>b</sup> [%]	13,0	17,9	21,8	22,7
	Hemmung [%] (auf K)	-	36,8*	48,1	42,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	17,9	8,9
<b>Tag 100</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	67,8	52,3	45,3	29,7
	Stabw. <sup>a</sup> [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,5	12,7	0,5	13,3
	CV <sup>b</sup> [%]	0,7	24,3	1,1	44,8
	Hemmung [%] (auf K)	-	22,8*	33,2	56,2
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	13,5	43,3*
<b>Tag 140</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	67,0	59,7	67,3	39,3
	Stabw. <sup>a</sup> [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,0	12,7	18,4	11,5
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	21,3	27,3	29,3
	Hemmung [%] (auf K)	-	11,9	-0,4	41,4
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-12,7	34,2

<sup>a</sup>Standardabweichung; <sup>b</sup>Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

Tabelle 74: Langzeitversuch 3 - Basalatumung

		Kontrolle (K)	Klärschlamm- Kontrolle (KK)	2,8 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 32</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,80	0,60	0,75	0,60
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,00	0,00	0,10	0,00
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	0,0	13,3	0,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	25,0**	6,3	25,0
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-25,0**	0,0
<b>Tag 60</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,47	0,40	0,48	0,30
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,06	0,12	0,13	0,14
	CV <sup>b</sup> [%]	12,4	28,9	26,5	47,1
	Hemmung [%] (auf K)	-	14,3	-1,8	35,7
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-18,8	25,0
<b>Tag 100</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,30	0,30	0,33	0,38
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,00	0,00	0,13	0,15
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	0,0	38,7	40,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	0,0	-8,3	-25,0
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-8,3	-25,0
<b>Tag 140</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,20	0,27	0,28	0,30
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,00	0,06	0,15	0,00
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	21,7	54,5	0,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	-33,3	-37,5	-50,0
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-3,1	-12,5

<sup>a</sup>Standardabweichung; <sup>b</sup>Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 75: Langzeitversuch 4 - Begleitanalytik zur Kläranlagensimulation**

<b>Anlage / Einlaufkonzentration [mg/L]</b>	<b>Versuchstag</b>	<b>TS-Gehalt Denitrifikation [g/L]</b>	<b>TS-Gehalt Nitrifikation [g/L]</b>	<b>pH Einlauf</b>	<b>pH Auslauf</b>	<b>pH Denitrifikation</b>	<b>pH Nitrifikation</b>	<b>Nitrat im Auslauf [mg/L]</b>	<b>Ammonium im Auslauf [mg/L]</b>	<b>Nitrit im Auslauf [mg/L]</b>
<b>Anlage 1: Kontrolle</b>	D0	2,3	1,7	7,8	7,5	7,4	7,1	8,1	0,5	1,5
	D2	2,6	2,2	7,6	7,8	7,5	7,2	7,8	0,2	0,9
	D4	n.b.	n.b.	7,5	7,6	7,3	7,1	n.b.	n.b.	n.b.
	D6	2,2	1,9	7,6	7,2	7,0	7,0	10,8	0,2	1,1
	D10	3,5	3,0	7,8	7,4	7,3	7,0	13,3	0,3	0,9
<b>Anlage 2: 0,04 mg/L</b>	D0	2,1	1,8	7,8	7,5	7,4	7,1	7,9	0,7	2,0
	D2	2,3	2,1	7,5	7,7	7,4	7,1	8,6	0,2	1,0
	D4	n.b.	n.b.	7,5	7,4	7,2	6,9	n.b.	n.b.	n.b.
	D6	2,7	2,3	7,6	7,2	7,2	7,0	9,4	0,2	0,9
	D10	2,8	2,6	7,7	7,4	7,2	7,0	12,0	0,1	0,8
<b>Anlage 3: 0,4 mg/L</b>	D0	2,7	1,7	7,8	7,6	7,6	7,2	4,9	2,0	3,4
	D2	2,3	2,1	7,7	7,2	7,6	7,0	9,3	0,2	3,9
	D4	n.b.	n.b.	7,6	7,3	7,3	7,0	n.b.	n.b.	n.b.
	D6	2,9	2,7	7,5	7,1	7,3	6,9	10,2	0,2	2,1
	D10	2,7	2,7	7,7	7,5	7,2	7,0	10,2	0,1	0,9

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 75

<b>Anlage / Einlaufkonzentration [mg/L]</b>	<b>Versuchstag</b>	<b>TS-Gehalt Denitrifikation [g/L]</b>	<b>TS-Gehalt Nitrifikation [g/L]</b>	<b>pH Einlauf</b>	<b>pH Auslauf</b>	<b>pH Denitrifikation</b>	<b>pH Nitrifikation</b>	<b>Nitrat im Auslauf [mg/L]</b>	<b>Ammonium im Auslauf [mg/L]</b>	<b>Nitrit im Auslauf [mg/L]</b>
<b>Anlage 4: 0,8 mg/L</b>	D0	2,4	2,3	7,8	7,5	7,4	7,2	6,2	0,9	2,5
	D2	2,6	2,4	7,7	7,7	7,4	7,2	6,4	0,1	1,3
	D4	n.b.	n.b.	7,5	7,3	7,3	7,0	n.b.	n.b.	n.b.
	D6	2,9	2,7	7,5	7,2	7,3	7,0	7,3	0,2	1,0
	D10	2,9	2,7	7,8	7,5	7,2	7,0	9,6	0,1	0,9
<b>Anlage 5: 1,6 mg/L</b>	D0	2,4	2,0	7,8	7,5	7,5	7,2	11,6	3,7	1,3
	D2	2,8	2,4	7,5	7,5	7,4	7,2	6,0	0,2	1,3
	D4	n.b.	n.b.	7,5	7,9	7,7	7,7	n.b.	n.b.	n.b.
	D6	3,0	2,8	7,4	7,3	7,3	7,0	7,1	0,2	1,4
	D10	2,7	2,6	7,8	7,4	7,2	7,0	10,1	0,1	1,3
<b>Anlage 6: 0,4 mg/L</b>	D0	2,7	2,4	7,7	7,6	7,5	7,3	5,9	4,9	2,4
	D2	3,0	2,7	7,5	7,7	7,4	7,2	5,2	0,1	2,9
	D4	n.b.	n.b.	7,5	7,4	7,3	7,1	n.b.	n.b.	n.b.
	D6	3,3	3,0	7,6	7,2	7,3	7,0	6,3	0,3	1,8
	D10	2,8	2,7	7,9	7,6	7,3	7,1	7,3	0,1	1,5

Tabelle 76: Langzeitversuch 4 - DOC-Elimination bei der Kläranlagensimulation

Anlage	Phase	Zeitpunkt	DOC Einlauf [mg/L]	DOC Auslauf [mg/L]	DOC Elimination [%]
<b>Anlage 1</b> <b>(Kontrolle)</b>	Vorlauf	D-2	102,7	11,8	89
	Haupttest	D0	113,1	4,5	96
		D2	102,4	3,8	96
		D4	107,4	5,0	95
		D6	110,8	4,8	96
		D8	104,0	4,4	96
		D10	104,9	2,9	97
<b>Anlage 2</b> <b>(NM-300K: 0,04 mg/L)</b>	Vorlauf	D-2	109,9	10,2	91
	Haupttest	D0	94,2	4,6	95
		D2	105,3	3,2	97
		D4	96,7	3,7	96
		D6	102,2	3,8	96
		D8	97,5	3,4	97
		D10	97,3	2,4	98
<b>Anlage 3</b> <b>(NM-300K: 0,4 mg/L)</b>	Vorlauf	D-2	115,1	11,5	90
	Haupttest	D0	112,9	3,7	97
		D2	109,4	3,3	97
		D4	104,5	3,9	96
		D6	98,9	4,0	96
		D8	101,6	3,0	97
		D10	98,0	2,7	97
<b>Anlage 4</b> <b>(NM-300K: 0,8 mg/L)</b>	Vorlauf	D-2	115,1	10,9	91
	Haupttest	D0	108,0	3,7	97
		D2	110,0	3,4	97
		D4	105,2	3,8	96
		D6	102,4	3,5	97
		D8	102,7	3,2	97
		D10	98,0	2,4	98

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 76

Anlage	Phase	Zeitpunkt	DOC Einlauf [mg/L]	DOC Auslauf [mg/L]	DOC Elimination [%]
<b>Anlage 5</b> <b>(NM-300K: 1,6 mg/L)</b>	Vorlauf	D-2	130,3	11,1	92
	Haupttest	D0	124,4	3,6	97
		D2	127,7	3,3	97
		D4	116,5	4,0	97
		D6	113,6	4,2	96
		D8	108,3	4,3	96
		D10	102,3	2,9	97
<b>Anlage 6</b> <b>(AgNO<sub>3</sub>: 0,4 mg/L)</b>	Vorlauf	D-2	130,2	12,4	91
	Haupttest	D0	125,1	4,8	96
		D2	120,9	3,7	97
		D4	111,6	3,0	97
		D6	109,3	3,4	97
		D8	108,8	2,7	98
		D10	102,7	2,7	97

**Tabelle 77: Langzeitversuch 4 - Potentielle Ammoniumoxidation**

		Kontrolle	Klärschlamm- kontrolle	0,3 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (NM-300K)	5,2 mg/kg TM (NM-300K)	9,0 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 11</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	33,3	1,3	0,1	2,2	0,4	3,5	3,5
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	4,7	2,0	0,2	2,1	0,8	3,8	7,1
	CV <sup>b</sup> [%]	14,1	153,1	200,0	94,2	200,0	110,1	200,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	96,1***	99,7	93,1	98,7	89,2	88,9
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	92,3	-69,2	69,2	-165,4	-173,0
<b>Tag 32</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	40,2	51,8	50,3	44,8	49,3	39,0	31,5
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	2,9	8,2	4,7	6,2	2,6	4,3	8,3
	CV <sup>b</sup> [%]	7,3	15,8	9,3	13,7	5,2	11,0	26,3
	Hemmung [%] (auf K)	-	-28,8*	-25,1	-11,5	-22,8	3,0	21,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	2,8	13,4	4,7	24,6**	39,0***
<b>Tag 60</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	42,6	40,3	39,9	38,4	33,8	17,0	25,0
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	3,4	2,6	5,6	2,1	1,9	3,3	1,1
	CV <sup>b</sup> [%]	8,1	6,5	14,0	5,5	5,5	19,3	4,6
	Hemmung [%] (auf K)	-	5,4	6,2	9,8	20,6	59,9	41,4
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	0,8	4,6	16,0*	57,6***	38,0***

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 77

		Kontrolle	Klärschlamm- kontrolle	0,3 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (NM-300K)	5,2 mg/kg TM (NM-300K)	9,0 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 100</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	46,8	47,0	41,8	38,1	18,4	13,5	17,8
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	6,7	6,1	3,6	3,6	3,1	3,6	8,1
	CV <sup>b</sup> [%]	14,3	12,9	8,6	9,4	16,7	26,8	45,7
	Hemmung [%] (auf K)	-	-0,4	10,6	18,7	60,7	71,2	62,0
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	11,0	19,0	60,8***	71,3***	62,1***
<b>Tag 140</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	33,7	12,9	13,1	5,9	0,4	0,0	1,6
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	2,1	2,3	3,5	6,9	0,7	0,0	3,1
	CV <sup>b</sup> [%]	6,3	18,2	26,9	115,5	200,0	0,0	200,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	61,9***	61,2	82,4	99,0	100,0	95,4
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-1,8	53,8	97,3**	100,0***	88,0**

<sup>a</sup>Standardabweichung; <sup>b</sup>Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 78: Langzeitversuch 4 - C-Transformation**

		Kontrolle	Klärschlamm- kontrolle	0,3 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (NM-300K)	5,2 mg/kg TM (NM-300K)	9,0 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 11</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	67,0	112,3	127,3	157,0	135,0	129,3	135,0
	Stabw. <sup>a</sup> [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,0	22,5	13,3	59,2	0,0	11,5	0,0
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	20,0	10,4	37,7	0,0	8,9	0,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	-67,7**	-90,0	-134,3	-101,5	-92,9	-101,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-13,4	-39,8	-20,2	-15,1	-20,2
<b>Tag 32</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	95,5	112,5	95,5	90,0	89,7	89,7	101,0
	Stabw. <sup>a</sup> [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	11,0	1,0	11,0	0,0	22,5	22,5	12,7
	CV <sup>b</sup> [%]	11,5	0,9	11,5	0,0	25,1	25,1	12,6
	Hemmung [%] (auf K)	-	-17,8*	0,0	5,8	6,1	6,1	-5,8
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	15,1*	20,0***	20,3	20,3	10,2
<b>Tag 60</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	95,5	90,0	90,0	67,3	67,0	45,0	51,0
	Stabw. <sup>a</sup> [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	11,0	0,0	0,0	22,5	0,0	18,0	10,7
	CV <sup>b</sup> [%]	11,5	0,0	0,0	33,4	0,0	39,9	21,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	5,8	5,8	29,5	29,8	52,9	46,6
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	0,0	25,2*	25,6*	50,0***	43,3***

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 78

		Kontrolle	Klärschlamm- kontrolle	0,3 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (NM-300K)	5,2 mg/kg TM (NM-300K)	9,0 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 100</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	67,0	61,8	39,3	74,7	29,7	22,0	45,0
	Stabw. <sup>a</sup> [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,0	21,5	11,5	34,2	13,3	0,0	0,0
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	34,8	29,3	45,7	44,8	0,0	0,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	7,8	41,4	-11,4	55,7	67,2	32,8
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	36,4	-20,9	52,0*	64,4*	27,1
<b>Tag 140</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	45,3	67,7	59,7	52,3	52,3	59,7	67,3
	Stabw. <sup>a</sup> [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	0,6	23,0	12,7	12,7	12,7	12,7	22,5
	CV <sup>b</sup> [%]	1,3	34,0	21,3	24,3	24,3	21,3	33,4
	Hemmung [%] (auf K)	-	-49,3	-31,6	-15,4	-15,4	-31,6	-48,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	11,8	22,7	22,7	11,8	0,5

<sup>a</sup>Standardabweichung; <sup>b</sup>Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 79: Langzeitversuch 4 – Basalatmung**

		Kontrolle	Klärschlamm- kontrolle	0,3 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (NM-300K)	5,2 mg/kg TM (NM-300K)	9,0 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 11</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,73	1,83	1,68	1,85	1,75	1,88	1,75
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,06	0,10	0,10	0,26	0,13	0,29	0,06
	CV <sup>b</sup> [%]	7,9	5,2	5,7	14,3	7,4	15,3	3,3
	Hemmung [%] (auf K)	-	-148,9***	-128,4	-152,3	-138,6	-155,7	-138,6
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	8,2	-1,4	4,1	-2,7	4,1
<b>Tag 32</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,57	0,97	1,00	0,80	0,73	0,93	1,03
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,06	0,23	0,12	0,12	0,06	0,05	0,23
	CV <sup>b</sup> [%]	10,2	23,9	11,5	14,4	7,9	5,4	22,3
	Hemmung [%] (auf K)	-	-70,6**	-76,5	-41,2	-29,4	-63,2	-82,4
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-3,4	17,2	24,1	4,3	-6,9
<b>Tag 60</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,32	0,60	0,60	0,50	0,43	0,43	0,53
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,05	0,08	0,08	0,00	0,15	0,12	0,05
	CV <sup>b</sup> [%]	14,4	13,6	13,6	0,0	35,3	26,6	9,5
	Hemmung [%] (auf K)	-	-88,9**	-88,9	-57,4	-33,8	-36,4	-65,3
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	0,0	16,7*	29,2*	27,8*	12,5

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 79

		Kontrolle	Klärschlamm- kontrolle	0,3 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (NM-300K)	5,2 mg/kg TM (NM-300K)	9,0 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 100</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,38	0,23	0,25	0,28	0,37	0,30	0,25
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,04	0,05	0,06	0,05	0,12	0,00	0,06
	CV <sup>b</sup> [%]	9,3	22,2	23,1	18,2	31,5	0,0	23,1
	Hemmung [%] (auf K)	-	40,7	34,2	27,6	3,4	21,0	34,2
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-11,1	-22,2	-63,0	-33,3	-11,1
<b>Tag 140</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,20	0,37	0,27	0,23	0,23	0,27	0,33
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,00	0,21	0,06	0,06	0,06	0,06	0,15
	CV <sup>b</sup> [%]	0,5	56,8	21,7	24,7	24,7	21,7	45,8
	Hemmung [%] (auf K)	-	3,4	29,8	38,5	38,5	29,8	12,2
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-18,5	-3,7	-3,7	-18,5	-48,1

**Tabelle 80: Langzeitversuch 4 – Mikrobielle Bodendiversität (Enzymaktivität)**

Tag	Substrat	Element	Freisetzung von MUF/AMC [ $\mu\text{mol/L} \cdot (\text{g TM} \cdot \text{h})^{-1}$ ] $\pm$ Stabw. <sup>a</sup>						
			Kontrolle	Klärschlamm- kontrolle	0,3 mg/kg TM (NM-300K)	2,5 mg/kg TM (NM-300K)	5,2 mg/kg TM (NM-300K)	9,0 mg/kg TM (NM-300K)	3,4 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>D60</b>	4-MUF- $\beta$ -D-glucopyranosid	Kohlenstoff	1143 $\pm$ 450	1448 $\pm$ 415	1275 $\pm$ 506	1659 $\pm$ 584	1494 $\pm$ 211	1325 $\pm$ 169	1468 $\pm$ 275
	4-MUF-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid	Kohlenstoff	477 $\pm$ 177	624 $\pm$ 93	675 $\pm$ 226	607 $\pm$ 115	650 $\pm$ 197	572 $\pm$ 187	641 $\pm$ 170
	bis-(4-MUF)-phosphat	Phosphor	970 $\pm$ 109	935 $\pm$ 162	1183 $\pm$ 230	1067 $\pm$ 222	1083 $\pm$ 125	953 $\pm$ 191	966 $\pm$ 130
	4-MUF-phosphat	Phosphor	5133 $\pm$ 725	6810 $\pm$ 1303	6587 $\pm$ 367	5374 $\pm$ 261*	5702 $\pm$ 509*	5151 $\pm$ 639*	6249 $\pm$ 1069
	L-Leucin-AMC	Stickstoff	762 $\pm$ 122	764 $\pm$ 89	874 $\pm$ 85	661 $\pm$ 26	721 $\pm$ 172	595 $\pm$ 45*	666 $\pm$ 72
	L-Alanin-AMC	Stickstoff	1130 $\pm$ 489	1070 $\pm$ 75	1206 $\pm$ 70	999 $\pm$ 116	841 $\pm$ 76**	764 $\pm$ 162**	869 $\pm$ 17*
<b>D100</b>	4-MUF- $\beta$ -D-glucopyranosid	Kohlenstoff	846 $\pm$ 269	751 $\pm$ 112	1112 $\pm$ 182	969 $\pm$ 229	1272 $\pm$ 752	1362 $\pm$ 463*	1353 $\pm$ 254*
	4-MUF-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid	Kohlenstoff	451 $\pm$ 73	408 $\pm$ 131	370 $\pm$ 103	364 $\pm$ 253	438 $\pm$ 216	546 $\pm$ 232	591 $\pm$ 156
	bis-(4-MUF)-phosphat	Phosphor	899 $\pm$ 174	1118 $\pm$ 187	1093 $\pm$ 126	778 $\pm$ 174*	746 $\pm$ 116**	686 $\pm$ 240**	890 $\pm$ 120
	4-MUF-phosphat	Phosphor	4717 $\pm$ 323	5737 $\pm$ 201	6081 $\pm$ 265	5420 $\pm$ 269	4960 $\pm$ 646	4891 $\pm$ 632*	5761 $\pm$ 986
	L-Leucin-AMC	Stickstoff	581 $\pm$ 73	347 $\pm$ 33	376 $\pm$ 22	393 $\pm$ 123	390 $\pm$ 63	305 $\pm$ 12	633 $\pm$ 68***
	L-Alanin-AMC	Stickstoff	844 $\pm$ 43	755 $\pm$ 47	837 $\pm$ 31*	679 $\pm$ 65*	655 $\pm$ 68*	394 $\pm$ 57***	826 $\pm$ 16

<sup>a</sup> Standardabweichung; \* 0,05  $\geq$  p > 0,01; \*\* 0,01  $\geq$  p > 0,001; \*\*\* p  $\leq$  0,001

**Tabelle 81: Langzeitversuch 5 - Potentielle Ammoniumoxidation**

		Kontrolle (K)	Klärschlamm- kontrolle (KK)	1,4 mg/kg TM (NM-300K)	3,1 mg/kg TM (NM-300K)	2,9 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )	4,1 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 11</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ g TM * h]	35,5	29,0	24,0	23,5	23,0	29,4
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	3,0	4,5	5,7	8,3	5,6	9,3
	CV <sup>b</sup> [%]	8,3	15,7	23,7	35,2	24,5	31,7
	Hemmung [%] (auf K)	-	18,3*	32,5	33,7	35,2	17,3
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	17,4	18,8	20,7	-1,2
<b>Tag 32</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ g TM * h]	44,5	52,9	44,1	54,6	49,5	52,9
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	4,9	4,9	2,6	5,8	1,5	5,7
	CV <sup>b</sup> [%]	10,9	9,2	5,8	10,6	3,1	10,9
	Hemmung [%] (auf K)	-	-19,0*	0,9	-22,6	-11,1	-18,9
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	16,7**	-3,0	6,6	0,1
<b>Tag 60</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ g TM * h]	35,2	44,1	46,3	39,4	41,2	40,2
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	4,1	4,0	3,1	3,7	12,9	6,3
	CV <sup>b</sup> [%]	11,5	9,0	6,6	9,5	31,2	15,7
	Hemmung [%] (auf K)	-	-25,2**	-31,5	-11,8	-17,0	-13,9
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-5,1	10,7	6,5	9,0

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 81

		Kontrolle (K)	Klärschlamm- kontrolle (KK)	1,4 mg/kg TM (NM-300K)	3,1 mg/kg TM (NM-300K)	2,9 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )	4,1 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 100</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ g TM * h]	37,7	32,3	26,5	21,0	31,3	16,4
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	4,3	7,8	10,4	13,0	5,6	2,8
	CV <sup>b</sup> [%]	11,4	24,2	39,2	62,1	17,8	17,2
	Hemmung [%] (auf K)	-	14,5	29,9	44,5	17,1	56,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	18,0	35,1*	3,1	49,2*
<b>Tag 140</b>	Nitritproduktion [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ g TM * h]	35,7	22,2	27,2	17,5	16,9	6,4
	Stabw. <sup>a</sup> [ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g TM * h]	4,0	7,7	4,8	4,8	9,9	5,7
	CV <sup>b</sup> [%]	11,2	34,8	17,5	27,5	58,6	89,3
	Hemmung [%] (auf K)	-	38,0**	23,9	51,0	52,6	82,1
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-22,8	20,9	23,5	71,1**

<sup>a</sup> Standardabweichung; <sup>b</sup> Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 82: Langzeitversuch 5 – C-Transformation**

		<b>Kontrolle (K)</b>	<b>Klärschlamm- kontrolle (KK)</b>	<b>1,4 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>3,1 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>2,9 mg/kg TM (AgNO<sub>3</sub>)</b>	<b>4,1 mg/kg TM (AgNO<sub>3</sub>)</b>
<b>Tag 11</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	73,8	112,3	127,3	158,3	142,0	135,5
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	10,9	0,5	13,3	20,1	26,0	17,2
	CV <sup>b</sup> [%]	14,7	0,4	10,4	12,7	18,3	12,7
	Hemmung [%] (auf K)	-	-52,2***	-72,7	-114,6	-92,5	-83,7
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-13,4	-41,0**	-26,5*	-20,7*
<b>Tag 32</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	77,0	95,5	84,8	90,5	101,0	98,0
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	11,4	11,0	10,5	1,0	12,7	12,2
	CV [%]	14,8	11,5	12,4	1,1	12,6	12,4
	Hemmung [%] (auf K)	-	-24,0*	-10,1	-17,5	-31,2	-27,3
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	11,3	5,2	-5,8	-2,6
<b>Tag 60</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	84,0	84,3	78,5	72,8	78,8	78,5
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	10,4	11,5	13,3	11,5	22,5	13,3
	CV [%]	12,4	13,6	16,9	15,8	28,6	16,9
	Hemmung [%] (auf K)	-	-0,3	6,5	13,4	6,3	6,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	6,8	13,6	6,5	6,8

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 82

		Kontrolle (K)	Klärschlamm- kontrolle (KK)	1,4 mg/kg TM (NM-300K)	3,1 mg/kg TM (NM-300K)	2,9 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )	4,1 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 100</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	95,5	90,0	101,0	101,0	89,8	78,5
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	11,0	0,0	12,7	12,7	18,4	13,3
	CV [%]	11,5	0,0	12,6	12,6	20,5	16,9
	Hemmung [%] (auf K)	-	5,8	-5,8	-5,8	6,0	17,8
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-12,2	-12,2	0,3	12,8
<b>Tag 140</b>	Mikrobielle Biomasse [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	120,7	95,5	82,3	82,3	78,5	67,0
	SD [mg C <sub>mik</sub> /kg TM]	15,0	11,0	13,3	13,3	13,3	0,0
	CV [%]	12,4	11,5	16,1	16,1	16,9	0,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	20,9*	31,8	31,8	34,9	44,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	13,8	13,8	17,8*	29,8**

<sup>a</sup> Standardabweichung; <sup>b</sup> Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001

**Tabelle 83: Langzeitversuch 5 - Basalatmung**

		<b>Kontrolle (K)</b>	<b>Klärschlamm- kontrolle (KK)</b>	<b>1,4 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>3,1 mg/kg TM (NM-300K)</b>	<b>2,9 mg/kg TM (AgNO<sub>3</sub>)</b>	<b>4,1 mg/kg TM (AgNO<sub>3</sub>)</b>
<b>Tag 11</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,58	1,30	1,23	1,18	1,25	1,20
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,05	0,24	0,59	0,34	0,10	0,17
	CV <sup>b</sup> [%]	8,7	18,8	47,8	29,0	8,0	14,4
	Hemmung [%] (auf K)	-	-126,1***	-113,0	-104,3	-117,4	-108,7
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	5,8	9,6	3,8	7,7
<b>Tag 32</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,33	0,70	0,68	0,73	0,73	0,68
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,15	0,08	0,10	0,13	0,05	0,10
	CV <sup>b</sup> [%]	46,2	11,7	14,2	17,4	6,9	14,2
	Hemmung [%] (auf K)	-	-115,4***	-107,7	-123,1	-123,1	-107,7
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	3,6	-3,6	-3,6	3,6
<b>Tag 60</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,20	0,37	0,30	0,28	0,30	0,38
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,0	0,12	0,0	0,05	0,14	0,15
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	31,5	0,0	18,2	47,1	40,0
	Hemmung [%] (auf K)	-	-83,3*	-50,0	-37,5	-50,0	-87,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	18,2	25,0	18,2	-2,3

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 83

		Kontrolle (K)	Klärschlamm- kontrolle (KK)	1,4 mg/kg TM (NM-300K)	3,1 mg/kg TM (NM-300K)	2,9 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )	4,1 mg/kg TM (AgNO <sub>3</sub> )
<b>Tag 100</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,20	0,28	0,30	0,28	0,20	0,28
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,0	0,05	0,0	0,05	0,0	0,05
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	18,2	0,0	18,2	0,0	18,2
	Hemmung [%] (auf K)	-	-37,5*	-50,0	-37,5	0,0	-37,5
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-9,1	0,0	27,3**	0,0
<b>Tag 140</b>	Atmungsaktivität [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,20	0,30	0,33	0,33	0,23	0,23
	Stabw. <sup>a</sup> [mg O <sub>2</sub> /kg TM * h]	0,0	0,08	0,05	0,12	0,06	0,06
	CV <sup>b</sup> [%]	0,0	27,2	15,4	34,6	24,7	24,7
	Hemmung [%] (auf K)	-	-50,0*	-62,5	-66,7	-16,7	-16,7
	Hemmung [%] (auf KK)	-	-	-18,2	-21,2	15,2	15,2

<sup>a</sup> Standardabweichung; <sup>b</sup> Variationskoeffizient; \* 0,05 ≥ p > 0,01; \*\* 0,01 ≥ p > 0,001; \*\*\* p ≤ 0,001